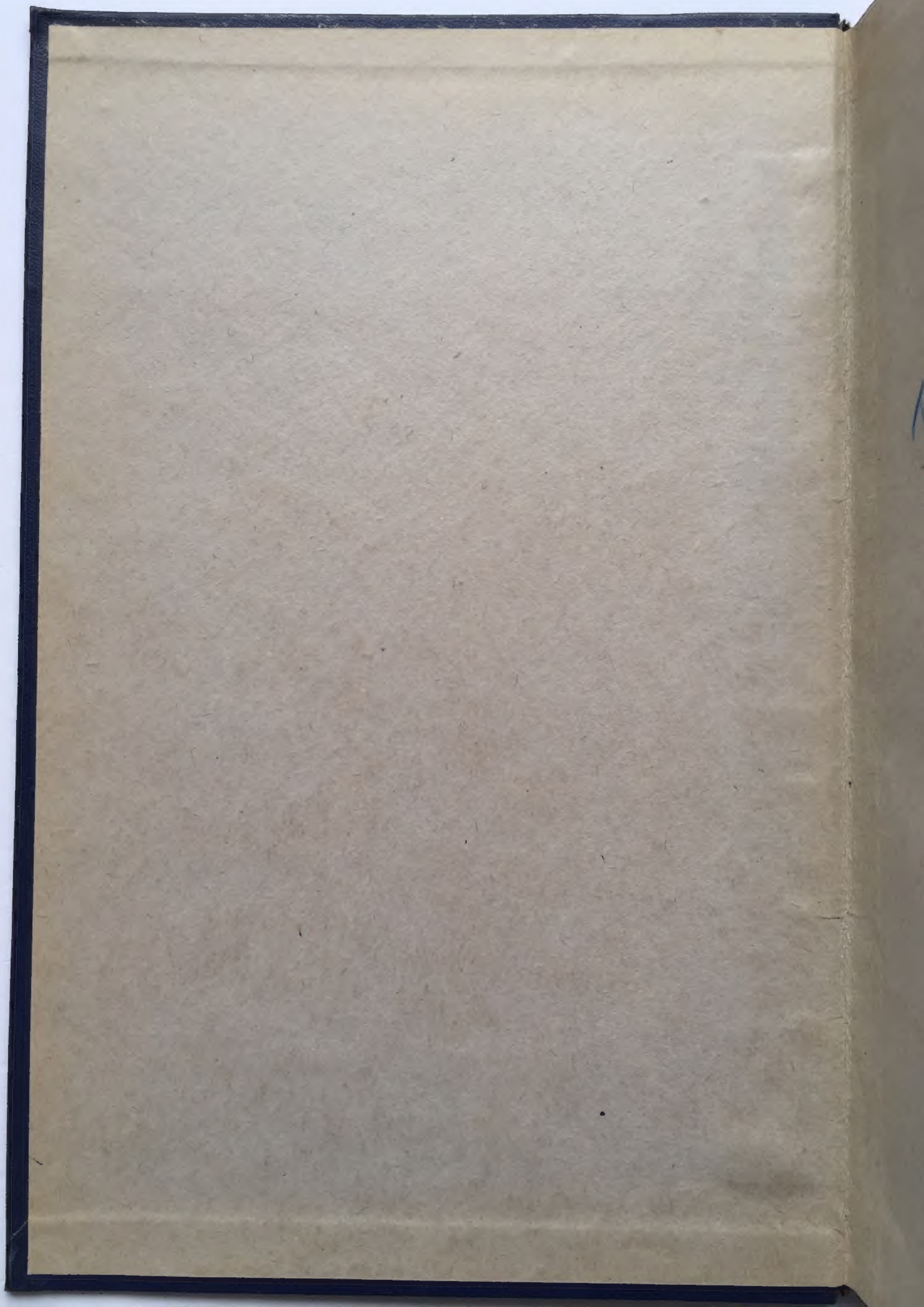


ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
ПРОЦЕССОВ
ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

МЕРЛИН • 1984



Бибинская кар.

ХИ

ЖИ

ГОСУДАР

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СОЮЗА ССР

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОЦЕССОВ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Под редакцией В. Н. ОРЕХОВИЧА

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО МЕДИЦИНСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
МОСКВА — 1962

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОЦЕССОВ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Редактор *Е. Д. Вышепан*
Техн. редактор *А. М. Миронова*
Корректор *В. Н. Самсонова*

Сдано в набор 18/IV-1962 г. Подписано к печати 15/XI-1962 г. . Формат бумаги 70×108¹/₁₆. 20,75 печ. л.
(условных 28,43 л.), 27,18 уч.-изд. л. Тираж 7 000 экз. Т-11690, МН-71. Заказ 323. Цена 1 р. 56 к.

Медгиз, Москва, Петроверигский пер., 6/8.
Полиграфический комбинат Ярославского совнархоза, г. Ярославль, ул. Свободы, 97.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Глава I. Химия, физико-химия и биологические свойства белков	5
1. В. Н. Орехович. Химическое строение и биологическая специ- фичность белков	5
2. В. О. Шпикитер. Структура белков и методы ее изучения	16
3. Л. А. Локшина. Методы исследования химического строения белков	25
Глава II. Химия и биохимия белковых комплексов	34
1. Г. В. Троицкий. Липопротеиды плазмы крови	34
2. Е. Л. Розенфельд. Особенности строения и свойств некоторых гликопротеидов крови	50
Глава III. Химическое строение и биологические свойства нуклеиновых кислот	66
1. В. С. Тонгур. Химия и физико-химия нуклеиновых кислот	66
2. В. С. Тонгур. Биохимия нуклеиновых кислот	73
Глава IV. Химия вирусов Т. И. Тихоненко	82
Глава V. Современные представления о биосинтезе антител А. Е. Гурвич	119
Глава VI. О белках системы свертывания крови В. А. Белицер, Е. Л. Ходорова и Т. В. Варецкая	146
Глава VII. Внутриклеточный обмен углеводов и биологическое окисление	156
1. С. Е. Северин. Гликолиз	156
2. С. Е. Северин. Пентозный цикл (прямое окисление углеводов)	174
3. С. Е. Северин. Биологическое окисление и окислительное фосфори- лирование	185
Глава VIII. Энергетическая характеристика промежуточных реакций обмена веществ Л. М. Гинодман	214
Глава IX. Свойства, функции и обмен стероидных гормонов коры надпо- чечников Н. А. Юдаев	234
Глава X. Вопросы патологии обмена белков и аминокислот	253
1. С. Я. Капланский. Некоторые проблемы патологии обмена аминокислот	253
2. С. Я. Капланский. Функции белков крови в норме и при различ- ных патологических состояниях	263
Глава XI. Ферменты в норме и патологии	274
1. А. А. Покровский. Диагностическое значение определения фер- ментов крови	274
2. А. А. Покровский. О механизме взаимодействия токсических веществ с ферментными системами	291
3. А. А. Покровский. Микроэкспресс-методы определения фер- ментной активности (техника проведения)	311

Ежегодно во всем мире выходит в свет свыше 40 000 статей по различным вопросам биохимии, что в среднем составляет около 120 статей в день. Тысячи научных работников активно изучают химические основы процессов жизни, используя сложнейшие и точнейшие современные методы. Развитие исследований идет широким фронтом и такими быстрыми темпами, что иногда в течение нескольких месяцев коренным образом меняются наши представления о тех или иных химических процессах, протекающих в организме.

Ни один биохимик не в состоянии прочитать все, что публикуется по вопросам биохимии в настоящее время. В еще более затруднительном положении находятся специалисты смежных областей биологии и медицины, у которых не только нет времени для изучения огромного и очень сложного материала, добываемого биохимиками, но и нет соответствующей подготовки в области химии и физической химии и отчасти физики и математики. Обобщить указанный материал и сделать соответствующие выводы можно только силами коллектива высококвалифицированных биохимиков, специализирующихся в различных областях биохимии. В связи с этим и были предприняты попытки создать данное коллективное пособие.

В феврале 1961 г. в Институте биологической и медицинской химии был проведен семинар работников биохимических кафедр медицинских вузов, на котором были прочитаны лекции по наиболее важным вопросам современной биохимии и патохимии. Эти лекции и публикуются в данной книге.

Охватить все разделы современной биохимии одним циклом лекций не представлялось возможным. Более того, оказалось практически невозможным осветить в одной книге даже все важные проблемы. Пришлось ограничиться рассмотрением наиболее острых в данный момент вопросов.

Много внимания в этой книге уделяется проблеме белков. Успехи в данной области поистине потрясающи. В настоящее время не только разгадано химическое строение и структура ряда белков, но даже осуществлен синтез некоторых простейших белковых веществ. Биохимики имеют возможность изучать тончайшие особенности химического строения белков, что позволит в ближайшее время решить такие фундаментальные вопросы, как видовая специфичность белков и несовместимость тканей, специфичность антител, особенности строения белков при некоторых патологических состояниях организма, механизм действия ферментов и гормонов белковой природы, связь между особенностями строения белков и их биологической активностью. В свете достижений в этой области рассматриваются и многие вопросы защитных механизмов организма — проблемы свертывания крови, биосинтеза антител и др.

Успехи в области препаративной белковой химии позволили по-новому подойти к проблеме белковых комплексов, этой важной проблеме биологической и медицинской химии. Данному вопросу посвящена особая глава.

Подробному разбору подверглись результаты исследований в области нуклеиновых кислот — области, получившей в настоящее время исключительное развитие. Особое место нуклеиновых кислот в процессах биосинтеза белков и процессах передачи признаков по наследству дает основание считать эту проблему одной из важнейших в современной биохимии.

Успехи в области химии и биохимии белков и нуклеиновых кислот привели к успешному решению ряда вопросов проблемы вирусов. Последний вопрос рассматривается в нескольких лекциях.

Несколько лекций посвящено очень важной проблеме биологического окисления и процессам углеводно-фосфорного обмена.

В современной медицине и биологии большое место занимают вопросы механизма действия гормонов и особенно стероидных гормонов. В книге имеется специальная глава, в которой затронуты только наиболее важные разделы этой проблемы. В нескольких лекциях разбираются вопросы патохимии обмена в свете достижений современной биохимии и клинической химии.

Само собой разумеется, что материалом, публикуемым в данной книге, далеко не исчерпываются все важные вопросы биохимии и патохимии, но мы и не ставили своей задачей создать руководство по всем разделам этой науки.

В этой книге публикуется только один цикл лекций по ряду важнейших разделов биохимии. Мы рассчитываем, что книга окажется полезной всем, кто живо интересуется биохимией и патохимией, и в первую очередь вопросами, которые в данное время изучаются особенно интенсивно и успешно.

В. Орехович

ГЛАВА I

ХИМИЯ, ФИЗИКО-ХИМИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

1. ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ БЕЛКОВ

В. Н. Орехович

Накопившиеся к настоящему времени многочисленные данные о строении, свойствах и функциях белков позволяют довольно ясно ответить на некоторые вопросы, волнующие с давних пор биологов, химиков и, в частности, биохимиков (см. обзорные статьи) [1—6].

Прежде всего имеются основания утверждать, что доказано пептидное строение белков. Точно определено химическое строение пептидных цепей ряда белковых веществ. Больше того, некоторые встречающиеся в природе биологически активные пептиды синтезированы (вазопрессин, окситоцин, меланоцитстимулирующий гормон и др.). Решен вопрос о сохранении нативных свойств в белковых веществах, выделяемых из тканей и органов. Хорошо известно, что кристаллический пепсин расщепляет в белках те же связи, что и неочищенный пепсин или натуральный желудочный сок. Кристаллические препараты химотрипсина и трипсина оказывают то же действие на белки, что и соответствующие ферменты, находящиеся в кишечном соке. Чистые, индивидуальные белковые вещества — гормоны, выделенные из организма, выполняют те же функции, что и соответствующие гормоны в организме. Если сок поджелудочной железы пропустить через колонку с диэтиламиноэтил-целлюлозой или смолой ХЕ-64 [7], то выделяются те же белковые вещества (трипсиноген, химотрипсиноген- α , химотрипсиноген В, прокарибоксипептидазы А и В, рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза и другие зимогены и ферменты), которые выделяются из тканей поджелудочной железы любыми другими приемами. Все эти факты полностью опровергают утверждение некоторых исследователей, что белки, выделенные из организма, нельзя считать нативными веществами, что они являются продуктом деградации нативных белков или же их комплексов. Само собой разумеется, что белки в организме не находятся в свободном состоянии, вне комплекса с другими веществами или же друг с другом. Однако это не означает, что они не являются строго индивидуальными химическими соединениями, имеющими уникальное строение и структуру и вполне определенную биологическую специфичность.

Современные методы препаративной белковой химии позволяют получать многие белки в виде индивидуальных, чистых веществ. Но при проверке с помощью методов электрофореза и хроматографии этих препаратов на

чистоту они довольно часто оказывались гетерогенными. Эта гетерогенность, вернее микрогетерогенность, индивидуальных белковых веществ может зависеть от очень многих причин. Потеря (отщепление) даже одной, а тем более нескольких амидных групп, разрыв одной—двух концевых пептидных связей, взаимодействие с некоторыми простейшими ионами, частичная денатурация и т. д. могут вызвать изменение физико-химических свойств этих белков. При очень мягких условиях эти изменения могут затронуть только небольшую часть молекул данного гомогенного белкового вещества. В результате при электрофорезе может появиться небольшое количество новых белковых примесей.

Такая возможность становится особенно реальной при работе с протеиназами. В качестве примера можно привести пепсин. Довольно часто в кристаллических препаратах пепсина содержатся «активные» примеси, обладающие специфичностью, близкой к пепсину. От этих примесей можно освободиться, но очень трудно освободиться от неактивных продуктов самопереваривания и продуктов денатурации фермента. Практически нельзя добиться выделения препарата с полной однородностью молекул пепсина, как, вероятно, и других белков. В природе безусловно существуют небольшие вариации в числе аминокислотных остатков в молекулах пепсина одного и того же вида животных. Кроме того, такие вариации возникают и в процессе выделения препаратов пепсина.

Разумеется, по мере усовершенствования методов электрофореза и хроматографии мы все чаще будем сталкиваться с микрогетерогенностью индивидуальных, чистых белковых веществ за счет небольших вариаций в зарядах, следовых примесей небелковых веществ и т. д. Однако такого рода гетерогенность не означает, что данное «гетерогенное» белковое вещество не является индивидуальным. Практически это не мешает изучению первичной структуры и биологической специфичности этих белков.

ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ БЕЛКОВ

а) Первичная структура белковых веществ

Как было сказано выше, пептидное строение белков можно считать доказанным. В настоящее время известен не только аминокислотный состав, форма и размеры молекул ряда белковых веществ, но и чередование аминокислотных остатков в пептидных цепях этих молекул. Достаточно хорошо известно строение инсулина. В последние годы было завершено изучение химического строения фермента рибонуклеазы. Этот белок имеет вдвое больший молекулярный вес, чем инсулин, и в его пептидной цепи насчитывается 124 аминокислотных остатка. Усилиями главным образом Мура и его сотрудников [8] расшифрована последовательность аминокислот в цепи этого белка¹.

Последовательность аминокислотных остатков изучается и в других белках. Расшифрована последовательность аминокислот вируса табачной мозаики, в папаине — последовательность 110 аминокислотных остатков из 180, в лизоциме — положение 105 аминокислотных остатков. Известно положение очень многих аминокислот в трипсине и химотрипсине, строение вазопрессина, окситоцина, меланоцитстимулирующих гормонов кортико-

¹ Перечисляются названия аминокислот в том порядке, в каком они расположены в полипептидной цепи рибонуклеазы. Приводятся только первые три буквы названия каждой аминокислоты (Ала. — аланин, Гли. — глицин и т. д., Асп-NH₂ — аспарагин, Глю-NH₂ — глютамин и т. д.).

NH ₂ Лиз.	Глю.	Тре.	Ала.	Ала.	Ала.	Лиз.	Фен.	Глю.	Арг.	Сер.	Тре.	Сер.	Сер.		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
NH ₂ 									NH ₂ 			NH ₂ 	NH ₂ 		
Асп.	Гис.	Мет.	Глю.	Ала.	Ала.	Сер.	Сер.	Сер.	Асп.	Тир.	Цис.	Сп.	Глю.		
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
					NH ₂ 										
Мет.	Мет.	Лиз.	Сер.	Арг.	Асп.	Лей.	Тре.	Лиз.	Асп.	Арг.	Цис.	Лиз.	Про.		
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42		
	NH ₂ 											NH ₂ 			
Вал.	Асп.	Тре.	Фен.	Вал.	Гис.	Глю.	Сер.	Лей.	Ала.	Асп.	Вал.	Глю.	Ала.	Вал.	
43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	
		NH ₂ 		NH ₂ 					NH ₂ 			NH ₂ 	NH ₂ 		
Цис.	Сер.	Глю.	Лиз.	Асп.	Вал.	Ала.	Цис.	Лиз.	Асп.	Гли.	Тре.	Асп.	Глю.	Цис.	Тир.
58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73
NH ₂ 															
Глю.	Сер.	Тир.	Сер.	Тре.	Мет.	Сер.	Иле.	Тре.	Асп.	Цис.	Арг.	Глю.	Сер.	Тре.	Гли.
74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89
				NH ₂ 								NH ₂ 	NH ₂ 		
Сер.	Лиз.	Тир.	Про.	Асп.	Ала.	Цис.	Тир.	Лиз.	Тре.	Тре.	Асп.	Ала.	Глю.		
90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103		
									NH ₂ 						
Лиз.	Гис.	Иле.	Иле.	Вал.	Ала.	Цис.	Глю.	Гли.	Асп.	Про.	Тир.	Вал.	Про.	Вал.	Гис.
104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
Фен.	Асп.	Ала.	Сер.	Вал.	COOH										
120	121	122	123	124											

тропинов. Успешно изучается строение гормона роста, строение антибиотиков-пептидов и т. д. Расшифровано строение глюкогона.

Несмотря на большие успехи в изучении первичной структуры белков, сделано еще очень мало и большая часть работы впереди. Необходимо отметить исключительную важность этой работы для решения многих проблем современной биологии.

б) Двухкомпонентность белковых молекул

Известно, что в результате кратковременного действия протейназ [9—12] молекула миозина распадается на два компонента, названные тяжелым меромиозином (ТММ) и легким меромиозином (ЛММ). Эти компоненты отличаются друг от друга не только по молекулярному весу (ТММ—230 000—320 000, ЛММ—100 000), но и по ряду других физико-химических и биологических свойств. Тяжелый меромиозин, в частности, взаимодействует с актином в тех же отношениях, что и миозин, а легкий меромиозин с актином вообще не взаимодействует. Скорость обновления фенилаланина [13] в ЛММ в 5 раз больше, чем в ТММ. Аналогичные данные были получены и в опытах с глицином [14]. Оказалось, что эта аминокислота включается в легкий меромиозин с большей скоростью, чем в тяжелый компонент. Очень интересные наблюдения были сделаны в опытах с флуоресцирующими антителами против ЛММ и ТММ [15]. С помощью этого метода удалось установить, что легкий и тяжелый меромиозины локализируются в саркомерах независимо друг от друга.

Все сказанное выше свидетельствует о том, что ЛММ и ТММ не артефакты, возникающие в результате обработки миозина протеолитическими ферментами, а реально существующие компоненты молекулы миозина. Вслед за этим мы неожиданно обнаружили двухкомпонентное строение молекул другого волокнистого белка (имеется в виду проколлаген) [16—23]. При исследовании седиментации проколлагена в 3 м. растворе мочевины после прогревания при 30° в течение 10 минут было обнаружено, что этот белок распадается на два компонента. Расщепление молекулы проколлагена на два компонента наблюдалось и при исследовании седиментации растворов проколлагена, предварительно обработанного 5 м. раствором KCNS в фосфатном буферном растворе при комнатной температуре или прогретого в виде суспензии в фосфатном буферном растворе при pH=8 в течение 20 минут при 70°. На основании приведенных выше данных мы пришли к заключению, что молекула проколлагена представляет комплекс двух компонентов, скрепленных в нативной структуре относительно слабыми, возможно, солевыми и водородными связями. Мы выделили эти компоненты и определили их молекулярные веса. Легкий компонент, названный нами α -проколлагеном, имеет молекулярный вес 125 000, а тяжелый β -проколлаген—290 000. Интенсивность включения радиоактивного глицина в легкий (α -компонент) в 4 раза больше, чем в тяжелый (β -компонент).

Если сравнить эти данные относительно проколлагена с соответствующими данными о миозине, то бросается в глаза поразительное совпадение. Как миозин, так и проколлаген распадается на легкий и тяжелый компоненты, молекулярные веса которых как для одного, так и для другого белка относятся, как 1 : 2. Включение меченых аминокислот, в частности глицина, происходит с большей интенсивностью в легкий компонент как в миозине, так и в проколлагене. Все это наводило на мысль, что двухкомпонентность является общей закономерностью строения волокнистых белков вообще. Однако дальнейшее изучение белков другого типа заставило нас расширить это заключение. Речь идет об обнаружении нами (Гинодман и В. Н. Орехович) двухкомпонентности молекулы пепсина. Нам удалось на колонке с диэтил-

аминоэтил-целлюлозой разделить на два компонента пепсин, инактивированный при $pH=8,6$. Один из этих компонентов имеет молекулярный вес приблизительно 20 000. Второй, содержащий фосфор, согласно расчетам, имеет молекулярный вес приблизительно 15 000—16 000. В настоящее время мы не можем дать более полной характеристики этих компонентов, но ясно, что эти компоненты реально существуют. Доказано [24, 25] и двухкомпонентное строение молекулы гемоглобина, которая состоит из двух абсолютно идентичных полумолекул с одинаковыми молекулярными весами (33 000). Каждый компонент в свою очередь состоит из двух пептидных цепей, отличающихся по N-концевому чередованию аминокислотных остатков. Одна пептидная цепь имеет чередование Вал. Лей. и вторая — Вал. Глю. Известны и другие примеры двухкомпонентного строения белковых молекул, в частности, можно назвать инсулин.

Все эти данные о двухкомпонентности молекул различных белков, а также данные о структуре нуклеиновых кислот позволяют предположить, что двухкомпонентность может быть присуща многим природным высокомолекулярным веществам. Естественно, возникает вопрос, как объяснить такую особенность строения высокомолекулярных белковых соединений. К сожалению, в настоящее время мы не располагаем убедительными данными, позволяющими сделать более или менее определенный вывод. В свое время нами был высказан ряд предположений по этому поводу в связи с изучением двухкомпонентности проколлагена. Теперь же нам хотелось бы поставить только один вопрос: нельзя ли распространить гипотезу о самоудвоении молекул нуклеиновых кислот и на белки, представив себе в самой общей форме (не пытаясь как-либо конкретизировать механизм этого процесса) тот же способ размножения белковых веществ — копированием себе подобных молекул. Если допустить возможность такого рода воспроизведения белков в организме, то надо ожидать, что двухкомпонентность как общий принцип строения белков будет доказан в ближайшее время.

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВИДОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ БЕЛКОВ

С давних пор известно, что одноименные белки, выделенные из тканей разных видов животных, значительно отличаются по иммунобиологическим свойствам. Долгое время не удавалось выяснить химические основы видовой специфичности белков, выполняющих у различных животных одну и ту же функцию и имеющих один и тот же тип строения. Больше того, белки эти практически не отличаются друг от друга по аминокислотному составу и по многим химическим и физико-химическим свойствам. В настоящее время эта задача разрешена. Хорошо известно, например, что инсулины, выделенные из поджелудочной железы различных животных, почти идентичны по строению их пептидных цепей. Отличие заключается только в аминокислотном составе участка цепи А в положении 8—10.

		8	9	10	
Инсулин	быка	— Ала.	Сер.	Вал.	—
»	овцы	— Ала.	Гли.	Вал.	—
»	свиньи	— Тре.	Сер.	Иле.	—
»	лошади	— Тре.	Гли.	Иле.	—
»	кита	— Тре.	Сер.	Иле.	—

Из приведенных данных следует, что идентичными по своему строению являются инсулины кита и свиньи. Такое совпадение для инсулинов разных видов позвоночных трудно понять, тем более что даже инсулины двух разных видов китов [26] отличаются по аминокислотному составу в положении 8—10. Так, у одного вида кита в цепи А инсулина в положении 8—10 имеют-

ся следующие аминокислоты—Ала. Сер. Тре.—, в то время как для другого вида кита в этом же положении характерно другое сочетание аминокислотных остатков — Тре. Сер. Иле.—

Были обнаружены различия и в рибонуклеазах разного происхождения [27, 28], но идентичных по энзиматическим свойствам и активности. Эти различия в положениях 3, 37, 99, 104 были установлены для ферментов, выделенных из поджелудочной железы быка и овцы. Так, было показано, что в положении 3 в рибонуклеазе быка имеется треонин, а у овцы — серин, в положении 37 в ферменте быка — лизин, а овцы — глутаминовая кислота.

Существенные видовые различия были обнаружены в строении кортикотропинов [29—35] — гормонов передней доли гипофиза, обладающих адрено-кортикотропной активностью. Из гипофиза свиньи были выделены А- и β-кортикотропины, овцы — α-кортикотропин и быка — кортикотропин. Все эти кортикотропины идентичны по биологическим свойствам и типу строения. Они представляют единую пептидную цепь, состоящую из 39 аминокислотных остатков. β-кортикотропин свиньи имеет следующее чередование аминокислотных остатков:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Сер.	Тир.	Сер.	Мет.	Глю.	Гис.	Фен.	Арг.	Три.	Гли.	Лиз.	Про.	Вал.
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Гли.	Лиз.	Лиз.	Арг.	Арг.	Про.	Вал.	Лиз.	Вал.	Тир.	Про.	Асп.	
26	27	28	29	30		31	32	33	34	35	36	
Гли.	Ала.	Глю.	Асп.	Глю.		Лей.	Ала.	Глю.	Ала.	Фен.	Про.	
37	38	39		NH ₂ .								
Лей.	Глю.	Фен.										

Кортикотропины разных видов животных отличаются по чередованию аминокислотных остатков в пептидной цепи в положении 25—32.

	25	26	27	28	29	30	31	32	
Кортикотропин быка	—	Асп.	Гли.	Глю.	Ала.	Глю.	Асп.	Сер.	Ала. —
α-кортикотропин овцы	—	Ала.	Гли.	Глю.	Асп.	Асп.	Глю.	Ала.	Сер. —
А-кортикотропин свиньи	—	Гли.	Ала.	Глю.	Асп.	Глю.	Лей.	Ала.	—
β-кортикотропин свиньи	—	Асп.	Гли.	Ала.	Глю.	Асп.	Глю.	Лей.	Ала. —

В β-кортикотропине свиньи в положении 25—28 имеется чередование Асп. Гли. Ала. Глю., а в α-кортикотропине овцы в этом же положении имеются те же аминокислотные остатки, но расположенные в ином порядке: Ала. Гли. Глю. Асп. В положении 31—32 в первом белке находятся — Лей. Ала.—, а во втором — Ала. Сер.

Несколько большие отличия в химическом строении имеют меланоцит-стимулирующие гормоны (МСГ) различного происхождения [36—37].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
β МСГ свиньи	Асп.	Сер.	Гли.	Про.	Тир.	Лиз.	Мет.	Глю.	Гис.	Фен.	Арг.	Три.
					13	14	15	16	17	18		
					Гли.	Сер.	Про.	Про.	Лиз.	Асп.		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
β МСГ быка	Асп.	Глю.	Гли.	Про.	Тир.	Лиз.	Мет.	Глю.	Гис.	Фен.	Арг.	Три.
					13	14	15	16	17	18		
					Гли.	Сер.	Про.	Про.	Лиз.	Асп.		

Как видно из приведенных выше данных, МСГ свиньи и быка являются пептидами одного и того же строения, но во втором положении в бычьем МСГ вместо серина имеется глутаминовая кислота, что существенным об-

разом изменяет физико-химические свойства этого гормона. Значительно большие отличия в аминокислотном составе установлены для β -МСГ человека. Этот гормон имеет в пептидной цепи не 18, а 22 аминокислотных остатка, причем с N-конца имеется следующее чередование: Ала. Глю. Лиз. Лиз. Что касается остальных 18 остатков, то они имеют то же чередование, что и МСГ быка и свиньи, за исключением положения 6, в котором в МСГ человека вместо лизина находится аргинин. Так как приведенный выше дополнительный тетрапептид не имеет значения для активности гормона, то остается не совсем ясным значение такого рода удлинения пептидной цепи.

Еще большие различия в химическом строении одного и того же по функции, но различного по происхождению белка были обнаружены для гормона роста [38, 39]. Гормоны роста человека и обезьяны имеют один и тот же молекулярный вес (25 000), но значительно отличаются по числу аминокислотных остатков некоторых наименований аминокислот. Бычий же гормон роста по молекулярному весу почти в 2 раза больше, чем соответствующий гормон человека и обезьяны.

Говоря о химических основах видовой специфичности белков, мы не можем настаивать, что во всех случаях обязательна разница в химическом строении одноименных белков различного видового происхождения. Более того, известны случаи, когда такого рода различия обнаружить не удавалось. Ранее мы уже приводили такой пример с инсулинами кита и свиньи. Сейчас нам хочется привести еще один пример [40] с цитохромом С. Этот белок особенно интересен тем, что он встречается почти у всех живых существ, начиная от простейших и кончая человеком, в организме которых выполняет одну и ту же функцию. Была изучена последовательность аминокислотных остатков в пептиде, содержащем цистеиновые остатки, за счет которых осуществляется тиоэфирная связь белка с порфирином.

Бык:	Вал.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{Глю.} \end{array}$	Лиз.	Цис.	Ала.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{Глю.} \end{array}$	Цис.	Гис.	Тре.	Вал.	Глю.	Лиз.
Лошадь:	—		Лиз.	Цис.	Ала.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{Глю.} \end{array}$	Цис.	Гис.	Тре.	Вал.	Глю.	Лиз.
Свинья:			Лиз.	Цис.	Ала.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{Глю.} \end{array}$	Цис.	Гис.	Тре.	Вал.	Глю.	Лиз.
Курица:	Вал.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{Глю.} \end{array}$	Лиз.	Цис.	Сер.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{Глю.} \end{array}$	Цис.	Гис.	Тре.	Вал.	Глю.	
Лосось:	Вал.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{Глю.} \end{array}$	Лиз.	Цис.	Ала.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{Глю.} \end{array}$	Цис.	Гис.	Тре.	Вал.	Глю.	
Шелкопряд:	Вал.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{Глю.} \end{array}$	Арг.	Цис.	Ала.	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{Глю.} \end{array}$	Цис.	Гис.	Тре.	Вал.	Глю.	
Дрожжи:	Фен.	Лиз.	Тре.	...	Арг.	Цис.	Глю.	Лей...	Цис.	Гис.	Тре.	Вал. Глю.

При рассмотрении приведенных выше данных бросается в глаза следующее. У всех млекопитающих этот пептид имеет одно и то же строение. Особенно интересно, что строение пептида, выделенного из цитохрома С рыб, идентично соответствующему пептиду млекопитающих. Небольшое отличие наблюдается у кур. В соответствующем пептиде в положении 5 вместо аланина находится серин. Пептид, выделенный из цитохрома С шелкопряда, практически идентичен соответствующему пептиду млекопитающих, так как замена в положении 3 остатка лизина остатком аргинина вряд ли имеет существенное значение.

Еще более интересные данные об идентичности одноименных гормонов—

пептидов у разных видов животных были получены при изучении окситоцина и вазопрессина. Оказалось, что препараты окситоцина человека, быка, свиньи, лошади, овцы, курицы полностью идентичны по аминокислотному составу и порядку чередования аминокислотных остатков в цепи. Вазопрессины человека, быка, лошади, овцы, крысы, собаки, обезьяны и верблюда идентичны и отличаются от вазопрессина свиньи тем, что в положении 8 вместо лизина находится аргинин.

Приведенные выше примеры достаточно хорошо иллюстрируют положение дел с решением вопроса о химической основе видовой специфичности белков. У нас есть основания надеяться, что эта проблема будет решена в ближайшем будущем.

Разбирая вопрос о химической основе видовой специфичности белков, следует сказать несколько слов о возможности химической модификации белков в организме при патологических состояниях. К сожалению, мы пока не располагаем достаточным количеством фактов, которые позволили бы сделать какие-либо обобщения, но на одном очень интересном факте мы остановимся. Известно, что у людей, страдающих наследственной анемией (например, серповидной анемией), наряду с нормальным гемоглобином (гемоглобин А) содержатся еще гемоглобины, отличающиеся по ряду физико-химических свойств [41—42], в частности так называемые гемоглобин S и C. Исследование химического строения нормального гемоглобина и так называемых патологических гемоглобинов S, C, D показало, что они отличаются друг от друга по строению только одного небольшого участка пептидных цепей этого белка. Из гидролизатов этих гемоглобинов (А, S, C, D) были выделены восьмиленные пептиды и изучена последовательность в них аминокислотных остатков.

		1	2	3	4	5	6	7	8
Гемоглобин А		Вал.	Лей.	Лей.	Тре.	Про.	Глю.	Глю.	Лиз.—
» S		Вал.	Лей.	Лей.	Тре.	Про.	Вал.	Глю.	Лиз.—
» C		Вал.	Лей.	Лей.	Тре.	Про.	Лиз.	Глю.	Лиз.—
» D		Вал.	Гис.	Лей.	Тре.	Про.	Глю.	Гли.	Лиз.—

Как видно из приведенных данных, эти пептиды отличаются друг от друга только по одному аминокислотному остатку, находящемуся в положении 6 или 7. В пептиде нормального гемоглобина в положении 6 находится глютаминовая кислота, в гемоглобине S — валин и в гемоглобине C — лизин. В пептиде из гемоглобина D в положении 7 имеется глицин вместо глютаминовой кислоты в нормальном гемоглобине.

На первый взгляд, особенно учитывая недостаточные знания о зависимости между химическим строением и конфигурацией молекул, эти различия кажутся несущественными. Однако такое заключение, вероятно, ошибочно, и нужно думать, что с накоплением данных о структуре белков в связи со строением их пептидных цепей можно будет составить более ясное представление о значении этих, как будто маловажных видоизменений.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ И ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЭТИХ ВЕЩЕСТВ

Когда говорят о молекуле белка, то часто различают несколько уровней ее организации. Условно эти уровни определяются следующим образом: первичная структура молекулы белка — последовательность аминокислотных остатков в цепи, вторичная — степень и форма спирализации молекулы или, вернее, конфигурация цепи, третичная — пространственная конфигурация, «архитектура» молекулы. Часто говорят и о четвертичной структуре. Разумеется, далеко не всегда удастся разграничить эти уровни организации молекулы, тем более что существует тесная связь между химическим

строением цепи и ее пространственной конфигурацией (в определенных условиях среды).

Мы рассмотрим лишь некоторые данные о связи между первичной структурой белков и их биологической активностью. Как известно, гормоны задней доли гипофиза — вазопрессин и окситоцин — не только расшифрованы, но и синтезированы [43—50]. Окситоцин вызывает сокращения матки и действует на выделительную функцию молочной железы. Вазопрессин обладает прессорной и антидиуретической активностью (окситоцин в некоторой степени обладает и вазопрессорной, а вазопрессин — окситоциновой активностью). Эти два гормона являются пептидами, очень близкими по химическому строению:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Цис.	Тир.	Иле.	Глю-NH ₂ .	Асп-NH ₂ .	Цис.	Про.	Лей.	Гли. NH ₂
окситоцин								
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Цис.	Тир.	Фен.	Глю-NH ₂ .	Асп-NH ₂ .	Цис.	Про.	Лиз.	Гли. NH ₂
вазопрессин								

Если в положении 3 пептидной цепи окситоцина изолейцин заменить фенилаланином, а в положении 8 — лейцин лизином, то такое соединение будет уже вазопрессином.

Замена в окситоцине в положении 2 тирозина фенилаланином ведет к потере окситоциновой активности гормона на 95%. При замене изолейцина лейцином (в положении 3) гормон почти полностью инактивируется, в то время как замещение изолейцина валином снижает активность гормона только на 65%.

Замещение в положении глутамина изоглутамином или в положении 5 аспарагина изоаспарагином ведет к полной потере гормональной активности. Больше того, такого рода производные являются ингибиторами вазопрессина.

Если в окситоцине в положении 8 лейцин заместить аргинином, то такой видоизмененный гормон приобретает гибридные свойства. Он обладает одновременно окситоциновой и прессорной активностью.

В 1916 г. в задней доле гипофиза [51] был открыт гормон, влияющий на пигментацию. Этот гормон получал в разное время различные названия и сейчас чаще называется меланоцитстимулирующим гормоном (МСГ). Известны МСГ двух типов: α -, у которого концевые группы аминокислотных остатков блокированы, и β - со свободными N- и C-концевыми группами. α -МСГ, который пока обнаружен только в гипофизе свиньи, имеет следующее строение:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
CH ₃ CO.	Сер.	Тир.	Сер.	Мет.	Глю.	Гис.	Фен.	Арг.	Три.	Гли.	Лиз.	Про.	Вал. NH ₂

Строение β -МСГ, выделенного из гипофиза свиньи, быка и человека, приводится на стр. 10. Наибольшую активность имеет 13-членный пептид МСГ (3300 на 1 мг). β -МСГ свиньи имеет значительно меньшую активность (только 40% активности α -МСГ).

β -МСГ быка, как и β -МСГ свиньи, является 18-членным пептидом, но в отличие от МСГ свиньи в МСГ быка в положении 2 находится глутаминовая кислота вместо серина. Такое, казалось бы, незначительное изменение в аминокислотном составе этого гормона ведет к потере его активности на 90% (β -МСГ свиньи в 10 раз активнее β -МСГ быка).

Синтетический пентапептид Гис. Фен. Арг. Три. Гли., который соответствует участку пептидной цепи нативного α -МСГ в положении 6—10, практически гормональной активностью не обладает. Удлинение этого пептида с N-конца на один остаток глютаминовой кислоты приводит к появлению следов гормональной активности. Эта активность несколько увеличивается, если удлинить пептид тоже с N-конца еще на два остатка (метионин и серин). Синтезированный [52] 13-членный пептид с чередованием аминокислотных остатков и соответствующим α -МСГ обладает той же активностью, что и α -МСГ, выделенный из гипофиза свиньи. Если у α -МСГ деблокировать α -аминную группу, то активность этого гормона значительно уменьшается, но в месте с тем появляется кортикотропная активность, которая вообще не свойственна МСГ.

Необходимо сказать несколько слов и о кортикотропинах. Если сравнить последовательность аминокислотных остатков в α -МСГ и β -кортикотропине, то бросается в глаза полная идентичность α -МСГ с N-концевым 13-членным пептидом кортикотропина.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
α -МСГ	CH ₃ CO.	Сер.	Тир.	Сер.	Мет.	Глю.	Гис.	Фен.	Арг.	Три.	Гли.	Лиз.	Про. Вал.NH ₂
Последовательность в N-концевом пептиде β -кортикотропина		Сер.	Тир.	Сер.	Мет.	Глю.	Гис.	Фен.	Арг.	Три.	Гли.	Лиз.	Про. Вал...

Разница в данном случае заключается только в том, что N-концевая группа кортикотропина свободна, а в α -МСГ блокирована. В свете этих данных становится понятным, почему при деблокировании α -аминной группы в α -МСГ у этого гормона появляется хотя и незначительная, но все же ясно выраженная кортикотропная активность. Для проявления оптимальной кортикотропной активности необходимо сохранение с N-конца большинства аминокислотных остатков. Во всяком случае установлено, что синтетический 20-членный пептид, соответствующий участку 1—20 кортикотропина, обладает лишь незначительной гормональной активностью. В то же время отщепление от пептидной цепи гормона с C-конца нескольких остатков аминокислот не вызывает падения активности этого гормона.

На основании приведенных данных пока трудно дать рациональное объяснение зависимости между строением пептидов — гормонов и их биологической активностью. Ясно одно, что специфичность биологических функций веществ белковой природы определяется уникальностью химического строения пептидных цепей каждого из этих веществ.

В заключительной части статьи мы рассмотрим некоторые данные о первичной структуре некоторых белков в связи с их энзиматической активностью.

Если в первой части этого раздела мы пытались доказать, что уникальность первичной структуры белкового вещества определяет специфичность биологического действия каждого из этих соединений, то сейчас нам хотелось бы показать, что белки, обладающие какой-нибудь общей функцией, имеют и сходное строение участков пептидной цепи, определяющих проявление этой функции. Попытки выявить так называемые активные центры ферментов и изучить строение этих центров предпринимались и предпринимаются многими исследователями. Мы остановимся кратко лишь на одном вопросе, на изучении «активного центра» протеолитических ферментов.

Известно, что диизопропилфторфосфат (ДФФ) реагирует с трипсином и химотрипсином в отношении моль на моль. При этом активность ферментов почти полностью тормозится. Выяснилось, что ДФФ реагирует с одним из остатков серина молекулы фермента. Отсюда был сделан вывод, что дан-

[illegible]

Дальнейшие исследования в этом направлении будут способствовать успешному решению ряда кардинальных вопросов биологии и медицины.

1. Орехович В. Н. Успехи современной биологии, 1953, 35, 426
2. Пасынский А. Г., Белицер В. А. Успехи современной биологии, 1953, 36, 236.
3. Орехович В. Н., Алексеенко Л. И., Левдикова Г. А. Вестник АМН СССР, 1957, I, 12.
4. Орехович В. Н. Актуальные вопросы современной биохимии, 1959, I, 5.
5. Орехович В. Н. Актуальные вопросы современной биохимии, 1961, II.
6. Белицер В. А. Успехи современной биологии, 1960, 50, 3.
7. Keller P. J., Cohen E., Neurath H. J. Biol. Chem., 1958, 233, 344.
8. Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chem., 1960, 235, 633.
9. Gergely J. J. Biol. Chem., 1953, 200, 543.
10. Mihalyi E. J. Biol. Chem., 1953, 201, 197.
11. Mihalyi E., Szent-Györgyi A. G. J. Biol. Chem., 1953, 201, 211.
12. Gergely J., Gauche M. A. a. Karibian D. J. Biol. Chem., 1955, 212, 165.
13. Velick S. F. Biochim. Biophys. Acta, 1956, 20, 228.
14. Schapira G., Broun G., Dreyfus J. C., Kruh J. Compt. rend. soc. biol., 1956, 150, 944.
15. Holtzer H., Marshall J. M. Цит. по A. J. Hodge. Bioph. Sc. A. St. program. John Wiley, 1959, p. 421.
16. Орехович В. Н., Шпикитер В. О. ДАН СССР, 1955, 101, 529.
17. Орехович В. Н., Шпикитер В. О. ДАН СССР, 1957, 115, 137.
18. Орехович В. Н., Шпикитер В. О. Rec. Adv. Gel. and Glue Res. Pergamon Press. London, 1957.

19. Орехович В. Н. и Шпикитер В. О. Биохимия, 1958, 23, 285.
20. Орехович В. Н. и Шпикитер В. О. Science, 1958, 127, 1371.
21. Орехович В. Н. и Шпикитер В. О., Мазуров В. И., Кунина О. В. Bull. Soc. Chimie biolog., 1960, 17, 505.
22. Doty P., Nishihara T. В кн.: Rec. Adv. Gel. and Glue Res. Pergamon Press, London, 1957.
23. A. Piez Karl, Weiss Lewes. J. Biol. Chem., 1960, 235, 1987.
24. Perutz M. F., Liquori A. M. a. Fisrich. Nature, 1957, 167, 929.
25. Smith D. B., Perutz M. F. Nature, 1960, 188, 407.
26. Ishihara Y., Saito T., Ito Y., Fujino M. Nature, 1958, 181, 1468.
27. Aqvist S. E. a. Anfinsen C. B. J. Biol. Chem., 1959, 234, 1112.
28. Anfinsen C. B., Aqvist S. E., Cooke J. P., Jonsson B. J. Biol. Chem., 1959, 234, 1459.
29. White W. F. J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 503.
30. White W. F., Landmann W. A. J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 1711.
31. Bell P. H. J. Amer. Soc., 1954, 76, 5565.
32. Howard K. S., Shepherd R. G., Eigner E. A., Davies D. S., Bell P. H. J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 3479.
33. Shepherd R. G., Willson S. D., Howard K. S., Bell P. H., Davis S. B., Eigner E. A., Shakespeare N. E. J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 5067.
34. Li C. H., Geschwind I. I., Cole R. D., Raacke I. D., Harris J. I., Dixon J. S. Nature, 1955, 176, 687.
35. Li C. H., Dixon J. S., Chung D. J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 2587.
36. Geschwind I. I., Li C. H., Barnafi L. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 1003.
37. Harris J. I. Nature, 1959, 184, 167.
38. Li C. H., Popkoff H. Science, 1956, 124, 1293.
39. Li C. H. Cancer, 1957, 10, 698.
40. Tuppy H. В кн.: Symposium on Protein Structure. John. Wiley, London, 1957.
41. Pauling L., Itano H. A., Singer S. J. and Wells J. C. Science, 1949, 110, 543.
42. Hunt J. A. and Ingram V. M. Symposium on Protein Structure. John Wiley, London, 1957.
43. Vigneaud du V., Ressler C., Swar J. M., Roberts C. W., Katsoyannis P. G. J. Am. Chem. Soc., 1954, 78, 3115.
44. Vigneaud du V., Gisch D. T., Katsoyannis P. G. J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 4751.
45. Ressler C., Vigneaud du V. J. Am. Chem. Soc. 1958, 80, 3355.
46. Ressler C., Rachele J. R. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1958, 98, 170.
47. Lutz W. B., Ressler C., Nettleton D. E., Vigneaud du V. J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 167.
48. Bodansky M., Vigneaud du V. J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 1258.
49. Katsoyannis P. G., Vigneaud du V. Arch. Biochem. Biophys., 1958, 78, 555.
50. Katsoyannis P. G. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 109.
51. Li C. H. Adv. Proz. Chem., 1957, 12, 270.
52. Boissonas R. A., Gutmann S., Huguenin R. L., Jaquenoud P. A., Saudrin E. Helv. Chim. Act., 1958, 41, 1867.

2. СТРУКТУРА БЕЛКОВ И МЕТОДЫ ЕЕ ИЗУЧЕНИЯ

В. О. Шпикитер

Мы попытаемся кратко охарактеризовать состояние вопроса о структуре белковых веществ и указать наиболее распространенные физические и физико-химические методы, которые применяются для ее изучения. Более подробные сведения об успехах в изучении белков за последние годы можно найти в ряде обзоров [1—3].

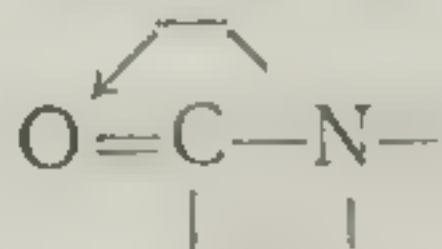
Для удобства изложения мы воспользуемся принятым представлением о существовании четырех порядков, или четырех структур, в организации молекул белковых веществ [4]. Первый порядок, или первичная структура,—

полипептидная цепь с определенной последовательностью чередования аминокислотных остатков. Вторым порядком — та пространственная конфигурация, которую принимает сама полипептидная цепь. Третий порядок — конфигурация, возникающая в результате складывания или закручивания структурных образований, соответствующих второму порядку. Объединение нескольких частиц, или, как их называют, субъединиц, в одну молекулу дает четвертый порядок, или четвертичную структуру.

Первичная структура

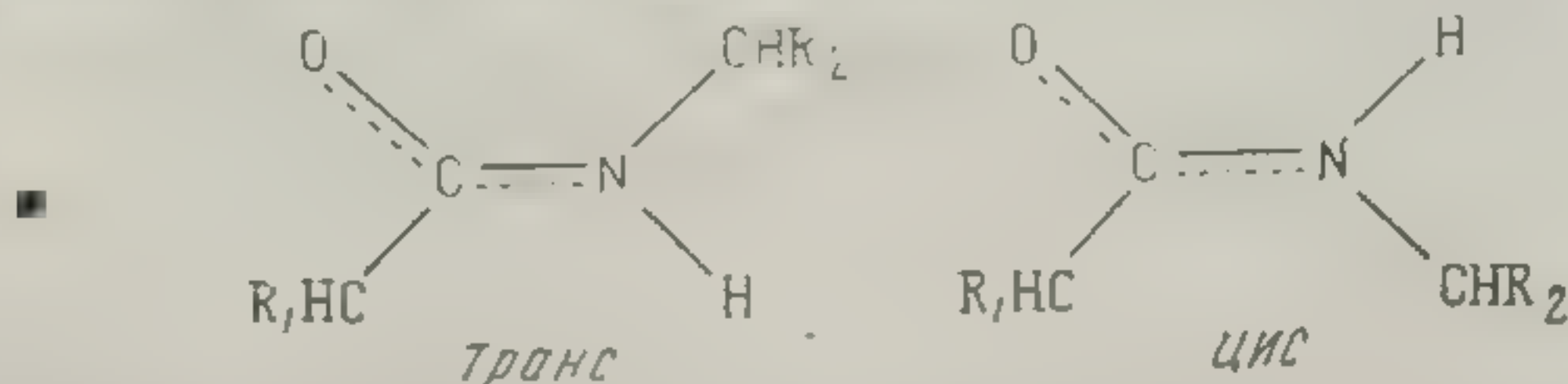
Химическим методам изучения структуры посвящено сообщение Л. А. Локшиной. В связи с этим мы остановимся только на двух вопросах — строении пептидной группировки и возможности поворотной изомерии в полипептидных цепях.

Одним из важных результатов изучения первичной структуры белков было установление копланарности пептидной группировки, $\text{CO}-\text{NH}$, т. е. расположения атомов данной группы в одной плоскости. Этот факт послужил одним из оснований, на которых была построена наиболее важная модель вторичной структуры белка — α -спираль. Копланарность заместителей при атомах азота и углерода пептидной группы объясняется тем, что пептидная связь является как бы частично двойной связью за счет сопряжения:



На частично двойной характер связи $\text{C}-\text{N}$ указывает то, что ее длина, равная $1,32 \text{ \AA}$, меньше длины подобной связи в первичных аминах ($1,47 \text{ \AA}$).

Пептидная группировка может быть в транс- и цис-положениях:



В белках обычно имеется только транс-форма пептидных групп.

Другим свойством первичной структуры является возможность вращения аминокислотных остатков вокруг связи у α -углеродного атома. В результате такого вращения могут возникать бесчисленные стерические структурные образования, которые в органической химии называют конформациями. Некоторые из таких поворотных изомеров могут оказаться стабильными. В подобном случае говорят об образовании устойчивых конформаций.

Поворотная изомерия аминокислотных остатков может играть большую роль в обеспечении лабильности белковых веществ, их высокой индивидуальности, служить важным фактором в образовании активных участков молекул, в формировании антител и др. Поворотная транс-цис-изомеризация пирролидиновых колец иминокислот имеет место при денатурации проколлагена и при превращениях гель-золь желатины [5—7].

Вторичная структура

Возможность вращения аминокислотных остатков в полипептидной цепи облегчает образование разнообразных конфигураций полипептидных цепей. Статистически наиболее вероятным и термодинамически наиболее устойчивым является такое состояние, когда цепи закручены в беспорядочный клубок. Однако в процессе биосинтеза формируются молекулы белков со строго упорядоченной и достаточно своеобразной конфигурацией поли-

пептидных цепей. Определенная конфигурация последних фиксируется вторичными связями, из которых наиболее важными для вторичной структуры являются водородные связи типа



образующиеся между карбонильными и иминными группами за счет положительно заряженного протона атома водорода между атомами кислорода и азота пептидных группировок.

Наиболее важными и, пожалуй, наиболее распространенными конфигурациями полипептидных цепей в белках являются спиральные.

Большое значение для выяснения структуры белков сыграла разработка Полингом и Кореем модели вторичной структуры — α -спиральной конфигурации полипептидных цепей [8,9]. На основании данных рентгеноструктурного анализа кристаллических пептидов и аминокислот установлены точные величины валентных углов и межатомных расстояний в этих соединениях. Полученные данные были использованы Полингом и Кореем для разработки наиболее вероятной конфигурации полипептидных цепей. При этом авторы исходили из следующих пяти постулируемых положений. Во-первых, в белках должны сохраняться валентные углы и межатомные расстояния, найденные у аминокислот и пептидов. Во-вторых, пептидные группы $CO=NH$ копланарны. В-третьих, все NH - и CO -группы связаны водородными связями длиной $2,79\text{\AA}$, направленными приблизительно по вектору от атома азота к атому водорода в группе NH . В-четвертых, все аминокислотные остатки в структурном отношении эквивалентны друг другу. В-пятых, винтовые оси симметрии могут быть нецелочисленными (целочисленность осей симметрии требовалась в соответствии с законами кристаллографии).

Перечисленным условиям удовлетворяли две упаковки атомов, или две спиральные конфигурации: α - и β -спирали, отличающиеся друг от друга по числу аминокислотных остатков, приходящихся на один виток. Из этих двух структур признание получила только α -спираль, в которой на один виток приходится 3,7 аминокислотных остатков (37 остатков на 10 витков), шаг витка составляет $5,44\text{\AA}$. Спираль может быть правой или левой (по часовой и против часовой стрелки соответственно). В белках обнаружена только правая форма α -спирали. Некоторые исследователи считают α -спираль универсальной чуть ли не для большинства белковых веществ. Действительно, такая конфигурация найдена во многих исследованных глобулярных белках. Однако соображения об универсальности подобной конфигурации следует считать преждевременными хотя бы потому, что число белков, подвергнутых глубокому структурному анализу, в настоящее время не так уж велико. Для некоторых фибриллярных белков, например, белков группы коллагена, α -спираль не может существовать вследствие большого количества в них громоздких аминокислотных остатков, изменяющих направление хода полипептидных цепей; для этих белков предложена другая спиральная конфигурация, причем не правая, а левая [10]. Для β -клатинов предложена модель вторичной структуры, называемая «складчатым слоем» [11], представляющая собой систему параллельно идущих полипептидных цепей, вытянутых в β -форму. Следует сказать, что и в тех глобулярных белках, в которых существование α -спиральной конфигурации подтверждено экспериментально, не вся вторичная структура представлена только спиралью, — последняя составляет лишь часть структуры; в другой части белка спирали отсутствуют вследствие напряжений, возникших в процессе биосинтеза белковых глобул. Искажения спиральной конфигурации должны быть в местах, где находятся остатки пролина, который вызывает изгиб полипептидной цепи.

Вторичная структура белковых веществ изучается с помощью различных методов. В принципе наиболее важным из них является рентгеноструктурный анализ, позволяющий получить полную атомную модель структуры белка, в том числе и вторичную структуру. Однако использование этого метода ограничено необходимостью иметь хорошо сформированные кристаллы белков и их производных толщиной и длиной по 0,1—0,2 мм, что часто не удается осуществить на практике. Кендрию с сотрудниками в результате обработки 400 рефлексов рентгенограмм кристаллов миоглобина получили разрешение до 6 Å и построили модель третичной структуры молекул этого белка. Обработка около 9000 рефлексов позволила им получить разрешение до 2 Å и построить модель вторичной структуры молекул миоглобина. При этом оказалось, что прямолинейные участки тяжей третичной структуры представляют собой правые α -спирали.

Из числа других методов изучения вторичной структуры наиболее распространенными являются: спектроскопия в инфракрасной области и изучение дисперсии оптического вращения.

Спектроскопия в инфракрасной области служит для изучения характера и направления водородных связей [12—14]. Водородные связи обнаруживают по смещению полос поглощения свободных NH-, CO- групп и др., происходящему в том случае, когда эти группы участвуют в образовании водородных связей. Частоты поглощения NH-групп лежат в области 3000 см^{-1} , CO-групп — в области 1500 см^{-1} , или 6 μ . По спектрограммам можно судить о химических группировках, участвующих в образовании водородных связей. С помощью изучения дихроизма в инфракрасной области спектра определяют направление водородных связей. Принцип метода состоит в определении степени поглощения поляризованных инфракрасных лучей ориентированным препаратом белка. В этом случае получают дихроическое отношение оптических плотностей, измеренных при направлении электрического вектора лучей, параллельном и перпендикулярном оси ориентации образца. По дихроическому отношению и определяют угол между направлением водородной связи и осью ориентации образца, например, белкового волокна. Метод инфракрасной спектроскопии довольно широко применяется в исследованиях белков. Однако серьезные помехи оказывает присутствие в препаратах воды, поглощающей в той же области, что и сами белковые вещества. Это обстоятельство вынуждает работать с сухими пленками белков и сильно ограничивает возможности метода. В последнее время предприняты попытки исследовать водные растворы белков с помощью двулучевых спектрографов, учитывающих фон за счет поглощения воды.

Для изучения водородных связей применяется также метод обмена водорода NH и других групп на дейтерий или тритий. Метод основан на измерении скорости обмена водорода, которая зависит от того, участвует атом водорода в водородной связи или нет. Например, в простых пептидах, в отдельной А-цепи инсулина все атомы водорода в NH-группах обмениваются меньше чем за одну минуту. В молекуле нативного инсулина, в котором NH-группы участвуют в образовании водородных связей, за несколько часов обменивается только около одной трети атомов водорода.

О наличии водородных связей судят также по изменению свойств белков в присутствии веществ, специфически разрывающих водородные связи. Таким веществом является, например, мочеви́на.

Основным и, пожалуй, в настоящее время единственным широко распространенным методом для изучения вторичной структуры является исследование дисперсии оптического вращения, т. е. изменения величины вращения плоскости поляризации света в зависимости от длины волн послед-

него. Простейшей математической зависимостью между величиной удельного вращения ($[\alpha]$) и длиной волны света λ является уравнение Друде [15]:

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{K}{\lambda^2 - \lambda_c^2},$$

где K — ротационная и λ_c — дисперсионная константы.

Интенсивное применение данного метода началось сравнительно недавно благодаря работам Моффита и др. [16, 17], а также Доти и сотрудников [18, 19]. Метод основан на том, что измеряемая величина удельного вращения является суммой величины вращения за счет оптически активных аминокислотных остатков и вращения за счет определенной конфигурации полипептидной цепи, т. е. вторичной структуры. Для белков, состоящих из α -форм аминокислот и содержащих правую спираль полипептидных цепей, первый член этой суммы отрицательный, второй — положительный. Разрушение спиралей, например при денатурации многих белков, приводит к уменьшению второго члена и увеличению отрицательного вращения, измеряемого в поляриметре.

Для определения степени спирализации молекул белков Доти [18] использовал своего рода калибровку данных изучения оптического вращения поли- γ -бензил- α -глутамата. Было найдено, что для этого соединения в виде беспорядочного клубка λ_c равняется 210 м μ , а при 40% спирализации его цепей (в виде α -спирали) λ_c составляет 260 м μ . Эти данные использовались для оценки количества спиралей по измеряемым величинам λ_c или $[\alpha]$ Д. В дальнейшем Доти и сотрудники [19] определяли долю аминокислотных остатков, находящихся в спиральных структурах, непосредственно по специальному уравнению. По их данным, в тропомиозине имеется 88%, в инсулине — 38%, бычьем сывороточном альбумине — 46%, яичном альбумине — 31%, лизоциме — 29%, пепсине — 31%, гистоне — 20%, рибонуклеазе — 16% и в глобине — 15% спиральных конфигураций.

Метод изучения дисперсии оптического вращения является весьма ценным для изучения вторичной структуры. Однако необходимо учитывать, что пока еще нет точных зависимостей между величинами дисперсионных параметров, видом и количеством спиральных структур в белковых веществах, поэтому всякого рода расчеты здесь имеют только ориентировочный характер.

Для изучения вторичной структуры также применяют исследования изменений молекул белков в области резких фазовых переходов в контролируемых экспериментальных условиях, например денатурационные изменения под влиянием различных физических и химических воздействий.

Третичная структура

Довольно простой расчет показывает, что если бы, например, молекула сывороточного альбумина представляла одну α -спираль, то при общем числе аминокислотных остатков, равном примерно 600, она имела бы форму палочки длиной около 900 Å при диаметре спирали 15 Å, т. е. отношение осей такой частицы равнялось бы $b/a=60$. Из опытных данных известно, что b/a для этого белка равняется 4. Приведенный пример указывает на то, что спиральные структуры в частицах глобулярных белков должны быть сложены или свернуты в компактную глобулу. Такая укладка стабилизируется рядом вторичных связей (вандерваальсовских, ярко выраженных электростатических и различных типов водородных связей). Весьма важными связями, фиксирующими третичную структуру многих белков, являются дисульфидные связи типа —S—S—, образованные в результате взаимодей-

ствия двух близлежащих остатков цистеина. У таких белков дисульфидные мостики являются своеобразными замками для третичной структуры; ключом в подобном случае будет разрушение этих связей путем окисления или восстановления.

Классическим примером третичной структуры является модель клубка спиралей из полипептидных цепей, впервые в истории изучения структуры белков построенная Кендрию и сотрудниками [20] на основании рентгеноструктурного анализа кристаллов миоглобина. Эта хорошо известная модель [3] представляет собой клубок совершенно беспорядочно расположенных в пространстве тяжей из полипептидных цепей. Аналогичная третичная структура имеется в субъединицах молекулы гемоглобина, изучение структуры которого успешно ведется Перутцем и сотрудниками [21]. Таковы два примера точно установленного вида третичной структуры. В настоящее время ведутся интенсивные исследования третичной структуры таких белков, как рибонуклеаза, инсулин и др.

Для изучения третичной структуры широко используется ряд методов, позволяющих устанавливать молекулярные веса, форму и размеры белковых молекул, а также судить об их изменениях. Об этих методах будет сказано в следующем разделе, посвященном четвертичной структуре.

Установление строения третичной структуры миоглобина, а также гемоглобина, о чем говорилось выше, проведено главным образом методом рентгеноструктурного анализа. Как известно, этот метод основан на дифракции рентгеновых лучей от плоскостей решеток кристаллов. По рефлексам на рентгенограммах находят расположение и размеры элементов структуры. Чем выше молекулярный вес вещества, чем больше атомов входит в состав его молекул, тем большее количество рефлексов необходимо иметь для расчета структурных параметров. Для исследования белков рентгеноструктурным методом требуются, как уже говорилось кристаллы этих веществ. Помимо рентгенограмм, от обычных кристаллов для расшифровки структуры используют так называемые изоморфно замещенные кристаллы белков, содержащие атомы тяжелых элементов, сильно рассеивающие рентгеновы лучи (ртути, платины, йода и др.). Для получения таких кристаллов белки обрабатывают, например, солями тяжелых металлов. Полученным производным белков дают кристаллизоваться и отбирают для анализа те кристаллы, которые являются кристаллографически тождественными (изоморфными) кристаллам неизмененного белка.

Четвертичная структура

Хорошим примером белка, имеющего четвертичную структуру, является гемоглобин, молекулы которого состоят из четырех субъединиц, или, иначе говоря, из двух α - и двух β -цепей гемоглобина. В результате разрыва вторичных связей (при действии мочевины, сдвиге pH и др.) происходит распад молекулы гемоглобина. Субъединицы гемоглобина имеют третичную структуру — такую же, как и молекулы миоглобина.

Четвертичную структуру могут стабилизировать те же связи, которые укрепляют третичную структуру. Однако в данном случае важную роль приобретают ионные связи с сильным электростатическим взаимодействием, а также в ряде случаев и водородные.

Приведенный выше пример не единичен. В настоящее время известно большое число белков, состоящих из отдельных субъединиц. К ним можно отнести инсулин, две цепи которого связаны дисульфидными связями [22]. Из двух субъединиц — тяжелого и легкого меромиозинов — состоит молекула миозина; интересно, что только один из меромиозинов обладает свойством сокращаться, а также аденозинтрифосфатазной активностью [23].

В свое время был обнаружен [24] распад молекул проколлагена на две субъединицы, названные α - и β -компонентами проколлагена. Недавно установлен распад на две субъединицы молекул β -лактоглобулина [25]. Вирус табачной мозаики представляет собой совокупность примерно 2000 белковых субъединиц, расположенных вокруг спиралевидной цепи рибонуклеиновой кислоты [26]. Можно было бы привести еще множество примеров белков с четвертичной структурой.

Большой интерес представляет обстоятельство, что четвертичная структура имеет значение в ферментативной активности. Сейчас мы уже можем перечислить ряд ферментов, диссоциирующих на субъединицы, для которых четвертичная структура определяет их каталитические функции. Таковыми являются амилаза [27], фосфорилаза [28], глутаминкодегидрогеназа [29]. Не исключена возможность, что при внимательном изучении в число таких ферментов попадут и многие другие, особенно имеющие сравнительно высокие молекулярные веса порядка 100 000.

При рассмотрении четвертичной структуры намечаются некоторые закономерности строения белков на этом уровне.

Создается впечатление, что в процессе биосинтеза белков образуются частицы со сравнительно малым молекулярным весом. Величину его пока трудно установить, но, возможно, она находится в пределах 5000—20 000. Эти частицы путем своеобразной агрегации дают специфические, уникально построенные большие частицы — молекулы.

Второй закономерностью построения четвертичной структуры белков, как и других высокомолекулярных соединений, может быть их двукомпонентность, о чем уже говорил в своей статье В. Н. Орехович. Это предположение было высказано нами в связи с работами по изучению гидротермического распада проколлагена на два компонента [30]. Его подтверждением является большое количество случаев распада белков на два компонента, отличающихся друг от друга по физико-химическим свойствам.

Для изучения четвертичной структуры белков применяются методы, позволяющие определять молекулярный вес, формулу, размеры частиц. К таковым относится ряд гидродинамических методов, например седиментация в ультрацентрифугах, изучение диффузии, двулучепреломления в потоке, диэлектрической релаксации, деполяризации флуоресценции, вязкости растворов. Широко применяются и оптические методы исследования: изучение светорассеяния, рассеяния под малыми углами рентгеновых лучей, электронная микроскопия. Представляет интерес изучение поверхностных явлений, диффузии через мембраны со стандартными порами и др.

Мы кратко рассмотрим лишь наиболее важные и широко применяющиеся методы, а именно метод изучения светорассеяния и различные приемы работы с использованием ультрацентрифуг.

Метод светорассеяния основан на измерении рассеяния света растворами веществ [31, 32]. Интенсивность рассеяния под углом 90° к направлению пучка лучей от источника света, определяемая величиной R_{90} , пропорциональна молекулярному весу:

$$R_{90} = KCM,$$

где K — постоянная для данной системы, C — концентрация, M — молекулярный вес. Такое уравнение справедливо лишь в том случае, когда молекулы в растворе малы по сравнению с длиной волны света и рассеяние света под всеми углами одинаково. Если размеры частиц в растворе превышают 200—300 Å, возникает интерференция лучей, рассеянных от различных точек частицы. В результате интенсивность рассеяния уменьшается по мере увеличения угла рассеяния Θ ; интерференция исчезает при $\Theta = 0$. Обычно измерения проводятся в диапазоне $\Theta = 30 - 135^\circ$, полученные данные отно-

сительно R_0 экстраполируют специальным графическим методом к R_0 и $C=0$. Из угловой зависимости рассеяния лучей находят размеры молекул. Метод светорассеяния характеризуется простотой аппаратуры и измерений, однако его использование осложняется трудностями освобождения растворов от пыли, присутствие которой сильно искажает результаты.

Для определения молекулярного веса, как известно, широко использовалось сочетание исследований седиментации с изучением диффузии или вязкости. Данные о константах седиментации и диффузии, а также о константе седиментации и величине характеристической вязкости используются для определения молекулярного веса и степени асимметрии частиц, выражаемой обычно в отношении полуосей гидродинамически эквивалентного эллипсоида [33].

В последние годы в исследованиях высокомолекулярных веществ с помощью ультрацентрифуг сделаны серьезные успехи. Вместо метода седиментации, в котором имеет место отход от мениска границы раздела раствор—растворитель и движение ее по направлению ко дну ячейки, можно применять методы изучения седиментационного равновесия. Принцип метода состоит в следующем: при сравнительно небольших скоростях вращения ротора (порядка 10 000 об/мин) достигают положения, когда перенос вещества ко дну ячейки нивелируется имеющим место переносом за счет диффузии. Аналогичное явление имеет место в распределении молекул газа в атмосфере земли. Изменение давления газа p с высотой h в гравитационном поле земли g определяется уравнением

$$\frac{dp}{p} = -\frac{Mg}{RT} dh.$$

При составлении уравнения для распределения веществ в ультрацентрифуге давление заменяют концентрацией, а для массы M делают поправку на силу гидростатического выталкивания (пловучесть):

$$\frac{dc}{c} = \frac{M(1 - V\rho) \omega^2 x \cdot dx}{RT}.$$

Путем измерения концентраций в различных участках ячейки (вернее, градиента концентраций dc/dx) при наличии седиментационно-диффузионного равновесия можно определить молекулярный вес. Для достижения такого равновесия требовалась непрерывная работа центрифуги в течение недели и больше, поэтому метод не нашел применения.

Данный метод в измененном виде под названием метода неустановившегося равновесия получил широкое распространение сравнительно недавно благодаря теоретическим исследованиям Арчибальда и практическому осуществлению Кегелсом [35, 34]. Оказалось, что условие метода седиментационного равновесия, т. е. отсутствие однонаправленного переноса вещества через границу, перпендикулярную радиусу ротора, всегда соблюдается вблизи дна ячейки и мениска раствора. Следовательно, через сравнительно короткое время после достижения полной скорости можно определить распределение концентраций в растворе у мениска или дна ячейки и отсюда рассчитать молекулярный вес по приведенному выше уравнению. Для метода характерны низкие скорости вращения ротора и небольшая затрата времени для проведения опытов.

Недавно применен еще один оригинальный прием для использования метода полного седиментационного равновесия. Исходя из того что время установления седиментационно-диффузионного равновесия обратно пропорционально высоте слоя жидкости, предложено проводить седиментацию с толщиной столбика или слоя раствора порядка 1 мм. При использовании

слоя 0,8 мм при 15 000 об/мин молекулярный вес рибонуклеазы был определен за 45 минут и для определения потребовалось около 0,6 мг белка [36].

Таковы принципы двух мощных методов и их разновидностей, применяемых для изучения молекулярного веса, формы и размеров молекул белков, а следовательно, и их изменений в тех или иных условиях опытов.

В заключение следует сказать несколько слов о взаимоотношении первичной структуры с остальными тремя структурами организации белковых веществ. Первичная структура белков с прочными ковалентными связями является наиболее стабильной. Химический состав оказывает большое влияние на вид конфигурации, который принимает вторичная и третичная структура, а в известной степени и четвертичная. Наличие большого количества остатков аминокислот (пролина, а для коллагеновых белков и оксипролина) сильно влияет на конфигурацию полипептидных цепей. Распределение остатков цистеина может иметь решающую роль в том, какую форму будет иметь третичная или четвертичная структура, стабилизирующаяся за счет дисульфидных мостиков между этими остатками. Тем не менее факторами, в значительной степени определяющими характер второго и других порядков структур, являются условия, в которых протекает биосинтез белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каверзнева Е. Д. Вестник АН СССР, 1959, № 8, 26—31.
2. Белицер В. А. Успехи современной биологии, 1960, 50, 1/4, 3—28.
3. Энгельгард В. А. Успехи химии, 1959, 28, 1011—1035.
4. Bernal J. Disc. Faraday Soc., 1958, No 25, 7—18.
5. Harrington W. Nature, 1958, 181, No 4614, 997—998.
6. Hirrel P., Harrington W. Biochim. Biophys. Acta. 1959, 36, 427.
7. Кунина О. В., Левдикова Г. А., Шпикитер В. О. Актуальные вопросы современной биохимии. Химия и механизм действия ферментов. Медгиз, 1961, т. II.
8. Pauling L., Corey R. Proc. Nat. Acad. Sci., 1951, 37, 205.
9. Белки. Под ред. Нейрат, Бейли. Перевод с англ. М., 1956, т. II, 151.
10. Rich A., Crick F., Nature, 1955, 176, No 4489.
11. См. (9) стр. 166.
12. См. (9) стр. 385.
13. Беллами Л. Инфракрасные спектры молекул. Перевод с англ. М., 1957.
14. Физические методы в органической химии. Под ред. Вайсбергера. Перевод с англ. М., 1955, т. IV, гл. 24, стр. 108.
15. Друде П. Оптика ОНТИ, 1935, стр. 341.
16. Moffit W. J. Chem. Phys. 1956, 25, 467.
17. Moffit W., Yang J. Proc. Nat. Acad. Sci., 1956, 42, 596.
18. Yang J., Doty P. J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 498.
19. Doty P. Rev modern Physics, 1949, 31, No 1, 107.
20. Kendrew J., Bodo G., Donitz H., Parrish R., Wyckoff H. Nature, 1958, 181, No 4610, 662.
21. Perutz M., Rossmann M., Cullis A., Muirhead H., Will G., North A. Nature, 1960, 185, 416.
22. Sanger F. Bull. Soc. Chim. biol., 1955, 37, 23.
23. Белки. Под ред. Нейрат Бейли. Перевод с англ. М., 1959, т. III, ч. 2, стр. 460.
24. Орехович В. Н., Шпикитер В. О. ДАН, 1955, 101, 529, 1957, 115, 137.
25. Green D. J. Mol. Biol., 1959, 1, 54.
26. Тихоненко Т. И. Данный сборник, стр. 82.
27. Fischer E., Stein E. В кн.: The Enzymes ed. Boyer P., Lardy H. Myrbäck K., 1960, vol 4, p. 313.
28. Madson N., Cori C. J. Biol. Chem., 1956, 223, 1055.
29. Frieden C. Biochim. Biophys. Acta., 1958, 27, 431.
30. Орехович В. Н., Шпикитер В. О. Биохимия, 1958, 23, 285.
31. См. (9), стр., 229.
32. Stacey K. A. Lightscattering in physical chemistry. London, 1956.
33. См. (9), стр. 272.
34. Klainer S., Kegels G. J. Phys. Chem., 1955, 59, 952.
35. Klainer S., Kegels G. Arch. Bioch. Biophys., 1956, 63, 247.
36. Yphantis D. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, 88, 586.

3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ХИМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ БЕЛКОВ

Л. А. Локина

В изучении химического строения белков за последние 10—15 лет достигнуты большие успехи. В настоящее время эта область является одной из наиболее интенсивно разрабатываемых в биохимии. Основным направлением при изучении химического строения белков является выяснение последовательности расположения аминокислотных остатков в белковых молекулах, т. е. установление их первичной структуры.

Подходы для изучения последовательности расположения аминокислотных остатков в молекуле белков были разработаны главным образом в работах Сэнджера по расшифровке строения инсулина [1—3]. Со дня окончания этих работ прошло уже более 5 лет. За это время появилось большое число исследований по изучению химического строения белков, однако общий путь и основные методические приемы, намеченные в работах Сэнджера, пока остаются без изменения.

Для изучения строения инсулина Сэнджер использовал два подхода: 1—последовательное отщепление одного аминокислотного остатка за другим от N- или C-концевого участка полипептидной цепи, 2—расщепление молекулы белка на ряд более мелких обломков, изучение их строения и вывод общей последовательности аминокислотных остатков белка на основании сопоставления строения изученных фрагментов.

В связи с переходом к изучению строения белков, молекулярный вес которых значительно больше, чем у инсулина, изучение последовательности аминокислотных остатков на концевых участках молекулы само по себе оказалось недостаточным. В то же время 2-ой подход—расщепление молекулы белка и изучение строения более мелких ее обломков является в настоящее время основным для изучения первичной структуры белка.

РАСЩЕПЛЕНИЕ БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ

Для изучения последовательности расположения аминокислотных остатков в молекуле белка прежде всего разрушают его пространственную структуру. Если объектом изучения являются белки, имеющие четвертичную структуру [141], проводят дезагрегацию их молекул и выделяют отдельные субъединицы. Разрушение третичной структуры белков начинают с расщепления дисульфидных связей, которые, как известно, являются одним из основных типов связей, стабилизирующих третичную структуру [4]. Расщепление дисульфидных связей проводят, как правило, в условиях, при которых происходит разрыв водородных связей; в результате наблюдается одновременное разрушение вторичной и третичной структуры белковой молекулы.

Методы разрушения дисульфидных связей. Для разрушения дисульфидных связей в молекуле белка используют методы их окисления и восстановления [5,6]. Наиболее широкое применение получил метод окисления S-S-связей до сульфоновых кислот с помощью надмуравьиной кислоты. Этот метод, использованный в работе Сэнджера для получения А- и В-цепей инсулина [3], применяется сейчас практически во всех работах по изучению первичной структуры белка. Недостатком метода является разрушение под действием надмуравьиной кислоты остатков триптофана и метионина, поэтому при исследовании белков, содержащих названные аминокислоты, использование надмуравьиной кислоты сопряжено с трудностями [5]. В связи со сказанным в последние годы для разрушения S-S-связей в белке пред-

ложен ряд других методов [5,6]. Наибольший интерес из них представляет восстановление S-S-связей до SH-групп с помощью меркаптанов (в основном, тиогликолевой кислотой) и NaBH_4 . Для предотвращения окисления образующихся SH-групп проводят их карбоксиметилирование с помощью йодацетата. Метод восстановления S-S-связей белков меркаптанами более специфичен, чем восстановление их NaBH_4 , однако при использовании меркаптанов затруднен контроль за ходом реакции восстановления и иногда отмечаются побочные реакции. Тем не менее восстановление белков с помощью тиогликолевой кислоты с последующим карбоксиметилированием успешно использовалось при исследовании рибонуклеазы и лизоцима [5,7,8].

Весьма перспективным является, по-видимому, и метод разрушения S-S-связей с помощью сульфита, в результате взаимодействия с которым из каждого остатка цистина образуется две S-сульфоцистеинильные группы [6]. Метод очень специфичен и удобен, так как не требует дополнительного алкилирования SH-групп. Разрушение S-S-связей белка с помощью сульфита, предложенное Свенном [6], успешно использовалось Нейратом с сотрудниками и Хартли при исследовании строения трипсиногена и химотрипсиногена и соответствующих активных ферментов [9].

В результате расщепления дисульфидных связей из молекулы белка могут быть получены отдельные полипептидные цепи (в случае, если молекула белка состоит из нескольких полипептидных цепей). Если же молекула состоит из одиночной цепи, то ее структура сильно «упрощается» и она приобретает вид вытянутой полипептидной цепи. Отдельные полипептидные цепи, образующиеся после разрушения дисульфидных связей в молекуле белка, могут быть отделены друг от друга с помощью методов, используемых обычно для разделения белков. Так, например, А- и Б-цепи инсулина были разделены с помощью методов фракционного осаждения [3], путем электрофореза, хроматографии на ионнообменных смолах [10] и прогивоточного расщепления [11].

Частичный гидролиз белка. Для получения различных фрагментов из молекулы белка или отдельных полипептидных цепей используется ферментативный гидролиз [1,12]. Как известно, протеолитические ферменты пепсин, трипсин, химотрипсин, папаин и другие обладают определенной специфичностью, предпочтительно гидролизуют в белках пептидные связи, образованные теми или иными аминокислотными остатками. В результате из молекулы белка может быть получена серия пептидов различного размера и состава, которые подвергаются дальнейшему исследованию. Из названных ферментов наиболее узкой специфичностью обладает трипсин, расщепляющий пептидные связи, образованные COOH -группами аргинина и лизина [13]. Следовательно, под действием трипсина можно получить из молекулы белка сравнительно небольшое число пептидов. В настоящее время триптический гидролиз белка используется практически во всех работах по изучению первичной структуры белка для получения сравнительно крупных фрагментов молекулы. В 1956 г. Анфинсеном предложен метод, позволяющий еще больше сузить специфичность трипсина, используя в качестве субстрата для расщепления не свободный, а динитрофенилированный или карбобензоксиглицированный белок [12]. Вследствие блокировки $\Sigma\text{-NH}_2$ -групп лизина трипсин гидролизует в замещенном белке только пептидные связи, образованные COOH -группой аргинина, что позволяет выделить из молекулы белка еще более крупные фрагменты. Описанный метод весьма успешно использован автором при расшифровке строения рибонуклеазы [12], однако он не получил широкого распространения, что, вероятно, обусловлено трудностью разделения крупных динитрофенилированных пептидов.

Для получения мелких пептидов (ди-тетра-пептидов) из молекулы белка в ранних работах по изучению химического строения часто использова-

ли частичный гидролиз белка кислотами, главным образом концентрированной HCl при 37° [1, 12, 14]. В настоящее время этот способ гидролиза белка применяется обычно как вспомогательный на более поздних этапах работы при установлении строения отдельных крупных пептидов, выделенных из ферментативных гидролизатов.

Помимо ферментативного гидролиза, для избирательного расщепления определенных пептидных связей в молекуле белка предлагают ряд химических методов. Например, для расщепления пептидных связей, образованных COOH-группой триптофана, рекомендуют использовать N-бромсукцинимид [15]; для гидролиза пептидных связей, образованных остатками серина и треонина, — обработку белка концентрированной серной или муравьиной кислотой [16]. Однако пока названные методы не нашли широкого применения.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ СМЕСИ ПЕПТИДОВ

Для изучения строения отдельных пептидов, образующихся в результате расщепления белковой молекулы, необходимо провести их разделение. Разделение смеси пептидов представляет пока весьма сложную задачу, от решения которой в большой степени зависит успех всей работы по выяснению последовательности аминокислотных остатков в молекуле белка. Из 3 групп методов, используемых в настоящее время для фракционирования сложных смесей близких по своим свойствам веществ, а именно хроматографических, электрофоретических методов и метода противоточного распределения, для разделения смесей пептидов наибольшее распространение получили методы хроматографии и главным образом метод хроматографии на ионообменных смолах.

Начиная с работ Хирса, Мура и Штейна по расшифровке строения рибонуклеазы, в которых для разделения смесей пептидов была использована полистироловая сульфосмола катионит Дауэкс-50, сейчас почти во всех работах по изучению первичной структуры белков применяется хроматография на ионообменных смолах и в основном на Дауэкс-50 [10]. Смолы, используемые для разделения пептидов, отличаются от соответствующих, употребляемых для разделения аминокислот, меньшим числом поперечных связей (2% вместо 8%), что облегчает проникновение в смолу более крупных частиц [10]. Для снятия пептидов с колонки обычно используют технику градиентной элюции с применением градиента pH и концентрации буфера. В последние годы для элюции пептидов с колонки успешно применяют летучие буфера, например, аммонийно-ацетатные, пиридин- или коллидин-ацетатные. Это позволяет получить с колонки пептиды, свободные от солей, что облегчает дальнейшую работу.

Необходимо заметить, что гидролизаты различных белков или гидролизаты одного и того же белка, полученные под действием различных ферментов, состоят из смесей весьма различных пептидов, поэтому в каждом отдельном случае приходится подбирать соответствующие условия для разделения. Так, например, использование смолы Дауэкс-50-X2, с успехом применявшейся для разделения гидролизатов рибонуклеазы [10], папаина [17], лизоцима [8] и некоторых других белков, при фракционировании пептидов, полученных из белка вируса табачной мозаики, не дало хороших результатов. Значительно лучшее разделение получено на анионите — полистироловой смоле (четвертичное аммонийное основание) Дауэкс-1-X2 [18]. Удачно были разделены на этой смоле также и пептиды из ферментативных гидролизатов гемоглобина [19]. Вполне возможно, что в ближайшем будущем Дауэкс-1-X2 найдет себе такое же широкое применение, как и Дауэкс-50. Помимо указанных смол, для разделения главным образом крупных или

сильно адсорбируемых на Дауэкс-50-X2 пептидов используется карбоксильная смола катионит JRC-50 [19].

Хотя при разделении на колонках из ионообменных смол часто удается получить пептиды в гомогенном состоянии, сама по себе симметричная форма пика не является достаточной характеристикой гомогенности вещества. В качестве контрольных методов, используемых для проверки индивидуальности веществ, а часто и для дальнейшего их разделения, применяют хроматографию и электрофорез на бумаге, а в последнее время — сочетание обоих методов. Эти методы обладают хорошей разделяющей способностью, однако они малоудобны для получения значительных количеств пептидов, необходимых для дальнейшей работы по изучению строения.

В препаративных целях, кроме хроматографии на ионообменных смолах, для разделения смесей пептидов довольно удачно используют противоточное распределение [11], например, при расшифровке строения АКТГ [11] в последних работах по изучению белка вируса табачной мозаики [20]. Однако этот метод требует специального довольно громоздкого оборудования и не получил такого широкого распространения, как хроматография на ионообменных смолах.

В первых работах по изучению химического строения белков (инсулина, окситоцина, вазопрессина и др.) в качестве начального этапа разделения смеси пептидов проводили групповое разделение пептидов, главным образом на основании их заряда, на кислую, нейтральную и основную фракции последующим делением каждой отдельной фракции [1, 14]. В настоящее время, однако, от этого приема почти отказались.

ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ ПЕПТИДОВ

После выделения отдельных пептидов выясняют их гомогенность и устанавливают химическое строение. Для этой цели прежде всего определяют аминокислотный состав пептидов, а затем с помощью методов определения N- и C-концевых аминокислот выясняют последовательность расположения аминокислотных остатков. Для определения химического строения крупных пептидов, кроме того, проводят их частичный гидролиз кислотой или ферментами и исследуют строение образовавшихся более мелких пептидов.

Для определения аминокислотного состава пептидов используют в основном метод Мура и Штейна. Создание автоматического анализатора, производящего определение полного аминокислотного состава белка за 24 часа, сильно облегчило работу по изучению первичной структуры белков.

Для определения N- и C-концевых аминокислот в пептидах и белках предложено много различных методов, которые подробно описаны в ряде обзоров [1, 2, 12, 14, 21 — 23]. Для определения N-концевых аминокислот наиболее широкое распространение получил динитрофенильный метод Сэнджера и фенилизотиоцианатный метод Эдмана. Динитрофенильный метод более широко применяют для определения N-концевых аминокислот, в то время как для определения N-концевой последовательности используют в основном фенилизотиоцианатный метод. В последние годы предложено несколько модификаций данного метода, например, проведение всей реакции на полосках бумаги, хроматографическое разделение фенилтиогидатионов и ряд других, которые значительно облегчают использование метода [23, 24]. С помощью фенилизотиоцианатного метода удавалось определять последовательность до 15 N-концевых аминокислотных остатков [24].

В последнее время для определения N-концевой последовательности используют ферментаминопептидазу, которая отщепляет от белков или пептидов аминокислоты со свободной NH_2 -группой.

Для определения С-концевых аминокислот в белках и пептидах применяют в основном два метода: карбоксипептидазный и гидразиновый [2]. Наиболее широкое распространение получил карбоксипептидазный метод, особенно для выяснения С-концевой последовательности аминокислот. Метод несколько ограничен вследствие специфичности фермента, так как обычно используемая в работе карбоксипептидаза А не отщепляет от белков и пептидов С-концевые пролин, аргинин и лизин. Применение наряду с карбоксипептидазой А карбоксипептидазы Б — фермента, отщепляющего от белков и пептидов С-концевые аргинин и лизин, расширяет возможности метода. При использовании карбоксипептидазы для определения С-концевых аминокислот в белках в случае одновременного обнаружения нескольких аминокислотных остатков часто трудно установить, отщепились ли аминокислоты от различных полипептидных цепей или образуют С-концевую последовательность одиночной полипептидной цепи. Для решения этого вопроса Ковальский и Бойер предлагают проводить расщепление белков карбоксипептидазой в среде, содержащей H_2O^{18} . В этом случае все отщепляющиеся аминокислоты, кроме С-концевых, будут содержать в карбоксильной группе O^{18} . Таким образом, можно дифференцировать С-концевые и срединно-расположенные аминокислотные остатки [25].

При определении С-концевых аминокислот гидразиновым методом в последние годы чаще всего используют модификацию метода, согласно которой С-концевая аминокислота определяется в виде динитрофенильного производного [21—23]. Недавно опубликована работа, в которой предложено использовать гидразиновый метод в сочетании с фенилизотиоцианатным; это, возможно, облегчит исследование С-концевой последовательности аминокислот [26].

Необходимо отметить, что использование ферментативных методов — аминопептидазного и карбоксипептидазного — для выяснения последовательности расположения аминокислотных остатков в белках и пептидах имеет одно существенное преимущество. С помощью этих методов удастся сразу установить расположение амидных групп у остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, чего нельзя сделать с помощью химических методов, так как амидные связи быстро разрушаются при кислотном гидролизе.

ВЫЯСНЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В МОЛЕКУЛЕ БЕЛКА

С помощью описанных выше методов определяют строение отдельных пептидов и после этого устанавливают общую последовательность расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи белка. Для этого сравнивают строение отдельных пептидов, находят среди них пептиды, имеющие «перекрывающиеся последовательности» аминокислотных остатков, выписывают их один за другим и таким путем устанавливают общую последовательность расположения аминокислотных остатков. Решение этой далеко не простой задачи можно продемонстрировать на примере расшифровки строения белка вируса табачной мозаики.

Белок ВТМ состоит из 2200 субъединиц, представляющих собой идентичные одиночные полипептидные цепи с молекулярным весом около 18 000 [27]. Изучение первичной структуры белка проводилось одновременно и независимо друг от друга в нескольких лабораториях, главным образом в лаборатории Шрамма в Германии и в лаборатории Стенли в Калифорнийском университете в США.

Показано, что С-концевой аминокислотой белка ВТМ является треонин, в то время как свободной N-концевой аминокислоты не было обнаружено. Из ферментативных гидролизатов белка выделен ацетилированный

пептид N-ацетилсерилтирозин. Поскольку в белке не было обнаружено свободной N-концевой аминокислоты, было сделано заключение, что N-концевое положение занимает N-ацетилсерин [27].

Из триптического гидролизата белка ВТМ, окисленного надмуравьиной кислотой, выделено 12 пептидов, которые разделены либо с помощью противоточного распределения [20], либо путем хроматографии на смоле Дауэкс-1-X2 [18]. Один из пептидов, состоящий из 41 аминокислотного остатка, был лишен N-концевой аминокислоты и содержал ацетилсерин, на основании чего было сделано заключение, что он занимает в молекуле белка ВТМ N-концевое положение. Из 12 выделенных пептидов 10 имели C-концевой аргинин, один — C-концевой лизин и один, занимающий C-концевое положение в молекуле, — треонин. Таким образом, из 12 пептидов сразу было установлено положение двух концевых пептидов, содержащих около $\frac{1}{3}$ всех аминокислотных остатков, входящих в состав белка. Для расположения остальных 10 пептидов необходимо было получить «связывающие» пептиды или, как их называют, «пептиды-мосты». С этой целью из пептического и химотриптического гидролизатов белка, а также из гидролизатов белка субтилизином были выделены и изучены пептиды, содержащие аргинин и лизин. Было выделено и изучено более 100 различных пептидов, из которых для установления порядка расположения пептидов триптического гидролизата и тем самым последовательности аминокислотных остатков белка потребовалось всего около 20. Строение белка ВТМ было установлено почти одновременно Шраммом с сотрудниками [18] и Стенли с сотрудниками [20]:

Ацет-N-Сер-Тир-Сер-Изол-Тре-Тре-Про-Сер-Глю-NH₂-Фен-Вал-
Фен-Лей-Сер-Сер-Ала-Три-Ала-Асп-Про-Изол-Глю-NH₂-Лей-Изол-
Лей-Асп-Цис-Тре-Асп-NH₂-Ала-Лей-Гли-Асп-NH₂-Глю-NH₂-Фен-
Глю-NH₂-Тре-Глю-NH₂-Глю-NH₂-Ала-Арг-Тре-Вал-Глю-NH₂-Вал-
Арг-Глю-NH₂-Фен-Сер-Глю-NH₂-Вал-Три-Лиз-Про-Сер-Про-Глю-
NH₂-Вал-Тре-Вал-Арг-Фен-Про-Асп-Сер-Асп-Фен-Лиз-Вал-Тир-
Арг-Тир-Асп-NH₂-Ала-Вал-Лей-Асп-Про-Лей-Вал-Тре-Ала-Лей-Лей-Гли-
Ала-Фен-Асп-Тре-Арг-Асп-NH₂-Арг-Изол-Изол-Глю-NH₂-Вал-Глю-
Асп-NH₂-Глю-NH₂-Ала-Асп-NH₂-Про-Тре-Тре-Ала-Глю-Тре-Лей-
Асп-Ала-Тре-Арг-Арг-Вал-Асп-Асп-Ала-Тре-Вал-Ала-Изол-Арг-Сер-
Ала-Асп-Изол-Асп-NH₂-Лей-Изол-Вал-Глю-Лей-Изол-Арг-Гли-Тре-
Гли-Сер-Тир-Асп-NH₂-Арг-Сер-Сер-Фен-Глю-Сер-Сер-Сер-Гли-Лей-
-Вал-Три-Тре-Сер-Гли-Про-Ала-Тре.

Результаты, полученные двумя группами исследователей, практически совпадают: отмечены лишь различия во взаимном расположении двух аминокислотных остатков (положение 55—56 и 137—138) и в обнаружении американскими авторами еще одного остатка изолейцина (94-е положение) в молекуле белка. Таким образом в молекуле белка ВТМ содержится 158, а не 157 аминокислотных остатков, как полагали Шрамм и сотрудники. Совпадение полученных данных свидетельствует об их достоверности, а также о надежности используемых методов исследования.

ВЫЯСНЕНИЕ РАСПОЛОЖЕНИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ

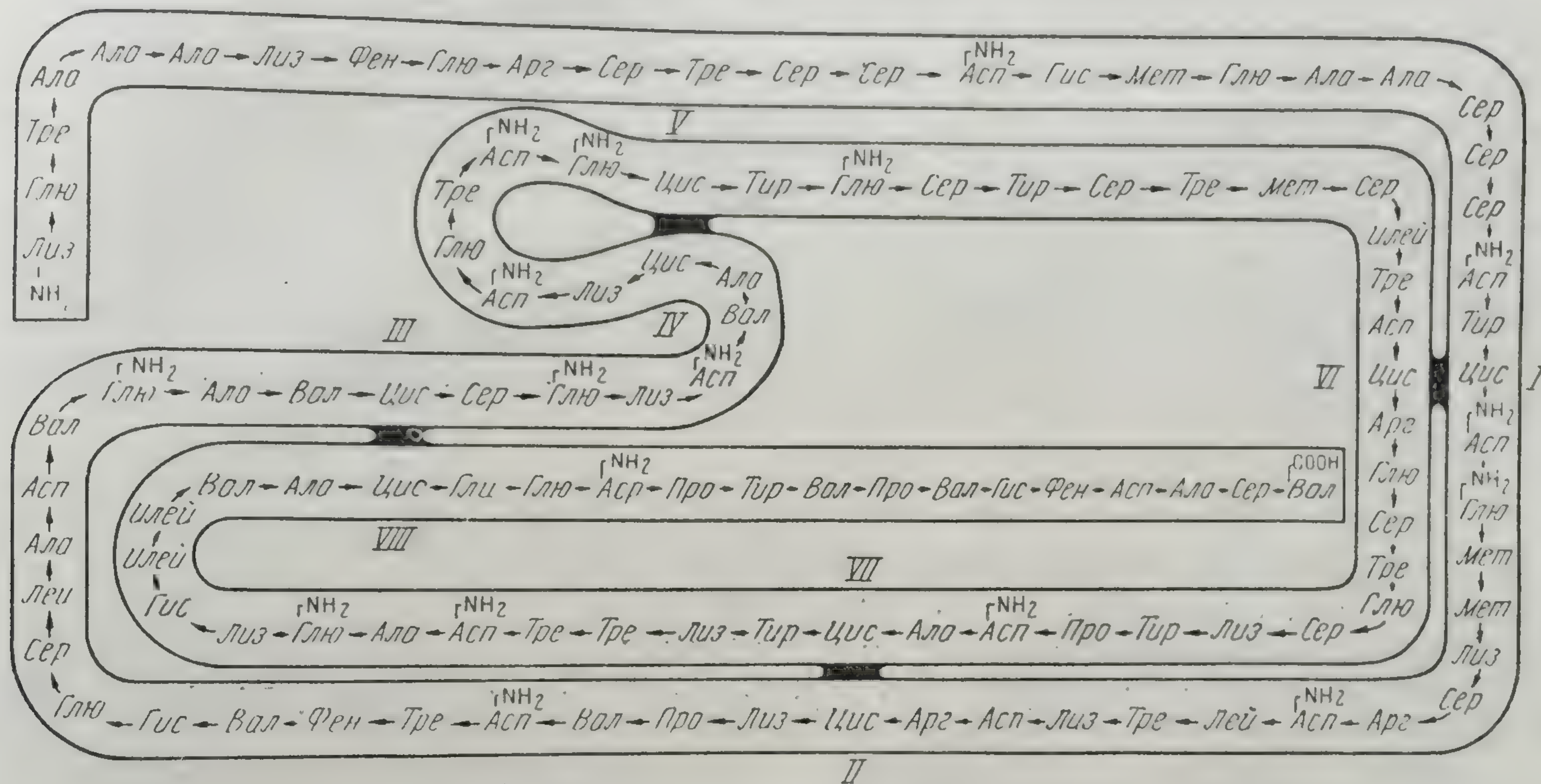
Последним этапом при расшифровке первичной структуры белков является выяснение локализации дисульфидных связей. К настоящему времени расположение дисульфидных связей в молекуле установлено только для двух белков: инсулина [3] и рибонуклеазы [7,28]. Для выяснения местоположения дисульфидных связей белок подвергают ферментативному и иногда частичному кислотному гидролизу, выделяют пептиды цистина, оки-

сляют их надмуравьиной кислотой, в результате чего из каждого пептида цистина получают по два пептида цистеиновой кислоты. Изучают строение этих пептидов, сравнивают с установленной ранее общей последовательностью аминокислотных остатков и, определив их положение в полипептидной цепи, выясняют локализацию дисульфидных связей. Для выяснения расположения дисульфидных связей необходимо проводить глубокий гидролиз белка, так как следует учитывать, что дисульфидные связи, соединяющие отдельные полипептидные цепи и создающие определенную «укладку» белковой молекулы, могут соединять друг с другом достаточно отдаленные участки полипептидной цепи или цепей. Так, например, в отношении рибонуклеазы установлено, что дисульфидные связи в молекуле белка соединяют остатки полуцистина, находящиеся в 26-м и 82-м положениях, 40-м и 109-м положениях, 63-м и 70-м положениях и 58-м и 94-м положениях [7,28]. В результате молекула рибонуклеазы приобретает форму, изображенную на рисунке.

Структура рибонуклеазы.

Из изложенного материала ясно, что расшифровка первичной структуры белка представляет собой в настоящее время очень сложную и трудоемкую задачу. В связи с этим делаются попытки поисков новых методических подходов для выяснения химического строения белков.

...результате молекула рибонуклеазы приобретает форму, изображенную на рисунке.



Структура рибонуклеазы.

Интересно отметить, что после восстановления дисульфидных связей и последующего их окисления замыкание дисульфидных связей в молекуле рибонуклеазы отмечалось на прежних местах [7].

чается в следующем: проводят ферментативное расщепление двух сравниваемых белков в одинаковых условиях; затем ферментативные гидролизаты разделяют на бумаге с помощью сочетания двух методов — высоковольтного электрофореза в одном направлении и хроматографии в перпендикулярном направлении. Разделение пептидов проводят в совершенно идентичных условиях, так как два сравниваемых гидролизата исследуют одновременно на одном и том же листе хроматографической бумаги. При сравнении полученных «пептидных карт» выявляют пептиды, отличающиеся по своему расположению; исследуют их и выясняют, таким образом, различия в строении белковых молекул.

Метод «отпечатков пальцев» нашел широкое применение. Он успешно использовался при сравнении некоторых белков: гемоглобинов[29]¹, рибонуклеаз, выделенных из различных видов животных [7], при сравнительном исследовании строения различных компонентов миоглобина[30], при исследовании строения ряда антител и неспецифических γ -глобулинов [31].

Примерно аналогичным способом проводилось сравнительное исследование строения предполагаемых «активных центров» ферментов: трипсина, химотрипсина и эластазы [32]. В этом случае для разделения частичных гидролизатов диизопропилфосфорилпроизводных ферментов наряду с методом сочетания электрофореза и хроматографии использовался двухмерный высоковольтный электрофорез [32]. Локализация пептидов, содержащих меченый фосфор, осуществлялась с помощью радиоавтографии. Сочетание высоковольтного электрофореза и хроматографии — методов с очень хорошей разделяющей способностью — с методом радиоавтографии, возможно, окажется очень перспективным для полного изучения первичной структуры белка [33].

ЛИТЕРАТУРА

1. S a n g e r F. Adv. Protein Chem., 1952, 7, 1.
2. S a n g e r F. Symp. Soc. Exptl. Biol., 1955, 9, 10.
3. S a n g e r F. Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 23.
4. Ш п и к и т е р В. О. Данный сборник.
5. M o o r e S., C o l e D., G u n d l a c h G., S t e i n W. Proc. 4 Intern Congr. Biochem., 1960, 8, 52.
6. S w a n J. Sulfur in Proteins, 1959, 3.
7. A n f i n s e n C. J. Cell. Comp. Physiol., 1959, 54, Sup. 1.
8. J o l l e s J., J o l l e s P. Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 407.
9. N e u r a t h H., D i x o n H., P e c h e r e L. Proc. 4 Intern. Congr. Biochem., 1960, 8, 63.
10. M o o r e S., S t e i n W., Adv. Protein Chem., 1956, 11, 191.
11. V o n T a v e l P., S i n g e r R. Adv. Protein Chem., 1956, 11, 238.
12. A n f i n s e n C., R e d f i e l d R. Adv. Protein Chem., 1956, 11, 2.
13. М о с о л о в В. Успехи современной биологии, 1957, X, IV, 300.
14. Л о к ш и н а Л. А., Т р о и ц к а я О. В., Успехи биол. химии, 1958, III, 3.
15. P a t c h o r n i k A., L a w s o n W., G r o s s E., W i t k o p B. J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 5923.
16. E d m a n P. Proc. 4 Intern. Congr. Biochem., 1960, 8.
17. L i g h t A., S m i t h E., J. Biol. Chem. 1960, 235, 3144.
18. A n d e r e r J., U h l i g H., W e b e r E., S c h r a m m G. Nature, 1960, 186, 922.
19. B r a u n i t z e r G., L i e b o l d B., M ü l l e r R., R u d l o f f V. H—S—Z physiol. Chem. 1960, 320, 170.
20. T s u g i t a A., G i s h D., J o u n g J., F r a e n k e l - C o n r a t H., K n i g h t C., S t a n l e y W. Proc. Nat. Acad. Sci., 1960, 46, 1463.
21. Т р о и ц к а я О. В. Актуальные вопросы современной биохимии, 1959, 65.
22. К н у н я н ц И. Л., П е р в о в а Е. Я. Успехи химии, 1955, 24, 641.
23. F r a e n k e l - C o n r a t H., H a r r i s J. a. L e v y A. Methods Biochem Anal., 1955, 11, 359.
24. E d m a n P. Ann N. Y. Acad. Sci., 1960, 88, 602.
25. K o w a l s k y A., B o y e r P. J. Biol Chem., 1960, 235, 604.

¹ См. статью В. Н. Ореховича, стр. 12.

26. Wallen P., Sjöholm J. Acta Chem. Scand., 1960, 14, 1749.
27. Fraenkel-Conrat H., Ramachandran L. Adv. Protein Chem., 1959, 14, 175.
28. Hirs C. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, 88, 611.
29. Ingram V. Proc. 4 Intern. Congr. Biochem., 1960, 8, 95.
30. Aekeson A., Theorell H. Arch. Biochem Biophys., 1960, 92, 310.
31. Гурвич А. Е. Данный сборник.
32. Naughton M., Sanger F., Hartley B., Shaw D. Biochem J., 1960, 77, 149.
33. Sanger F. Proc. 4 Intern Congr. Biochem., 1960, 8, 106.
-

ХИМИЯ И БИОХИМИЯ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

1. ЛИПОПРОТЕИДЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Г. В. Троицкий

В группу липопротендов относят комплексы белков и липидов, близкие к белкам по растворимости, отношению к солям, способности к денатурации. Комплексы, обнаруживающие свойства липидов, часто называют протео-липидами. Различия между обеими группами веществ не зависят от количественных соотношений полипептидной и липидной частей, а связаны, по-видимому, с их разным пространственным расположением. В крови содержатся комплексы обоего рода, однако в плазме самостоятельное существование протеолипидов не доказано.

Принято считать, что основная масса липидов плазмы входит в состав белковых комплексов, что белок является фактором, способствующим растворению липидов и, следовательно, определяющим их транспорт кровью. Хотя эта точка зрения в большинстве случаев хорошо аргументирована, нельзя полностью отрицать существования и свободных липидов плазмы.

Сам по себе факт наличия липидов в водном растворе (плазме) не является доказательством обязательного существования связей с белком, поскольку из тех же липидов можно искусственным путем приготовить довольно устойчивый коллоидный раствор, в котором стабилизатором являются липиды, содержащие полярные группы. При смешивании таких растворов с растворами белков устанавливаются тесные коллоидно-химические отношения, в результате которых вся система приобретает свойства белков.

Подобные факты затрудняют выбор признаков, на основании которых тот или иной комплекс можно отнести к липопротеидам. Если в качестве такого критерия выбрать постоянство химического состава комплекса при разных физиологических условиях, то количество липопротендов в плазме будет сравнительно небольшим, если же ограничиться определением, приведенным в начале статьи, то почти все липиды плазмы следует отнести к липопротеидам. Мы будем придерживаться последней точки зрения.

Вопрос о постоянстве химического состава липопротендов решается по-разному. Если для получения липопротендов пользоваться смешанной плазмой, получаемой от большого количества доноров, как это делали некоторые исследователи [1], то можно выделить две группы веществ постоянного химического состава, характеризующихся определенными молекулярными параметрами. Липопротенды, имеющие подвижность α -глобулина, так называемые α -липопротенды, содержащие 57% липидов и 43% белка с молекулярным весом 300 000 и размерами 300×50 Å, и липопротенды, имеющие подвижность β -глобулина (β -липопротенды), содержащие 77%

липидов и 23% белка. β -липопротеиды имеют молекулярный вес 1 300 000 и сферическую форму с диаметром 185 Å. Однако еще ранее Машбеф [2], а затем и другие авторы [3] показали, что соотношения липидной и белковой частей меняются при голодании за счет уменьшения липидной части. С другой стороны, в липемических сыворотках (например, у кроликов при алиментарной гиперхолестеринемии) содержание липидов во фракции β -липопротеидов доходит до 90% и выше [4,5]. Подобные соотношения отличают липопротенды от таких белков, как гемоглобин, в котором соотношения белковой и небелковой компоненты сохраняются постоянными при разных физиологических состояниях организма. Ясно, что постоянство соотношений в охарактеризованных выше липопротендах может быть следствием стандартного питания людей, плазма которых послужила исходным материалом для их получения.

Применение «свободного» электрофореза показывает, что основная масса липопротендов находится в составе α - и β -глобулинов. Между методами электрофореза в свободном растворе (по Тизелиусу) и электрофорезом в поддерживающих средах наблюдаются различия, связанные в последних случаях с наложением эффектов, зависящих от адсорбции и молекулярной фильтрации [6].

Так, например, крупные частицы липопротендов при свободном электрофорезе двигаются в составе β -глобулинов при электрофорезе в гелях и на бумаге и вследствие торможения в капиллярах среды оказываются в составе γ -глобулинов (с чем связано появление термина γ -липопротеиды). С другой стороны, такой липопротенд, как ρ_2 , имеющий небольшие молекулярные размеры при электрофорезе в геле агара, оказывается впереди альбумина, хотя при свободном электрофорезе имеет подвижность α_2 -глобулина. Имеются и другие отличия, особенно ярко проявляющиеся в случае гелей агара и крахмала [8—11].

Указанные особенности позволяют при помощи электрофореза в гелях открывать большее число фракций [12]. Однако если стоит задача характеристики белка по подвижности, то преимущества метода свободного электрофореза неоспоримы, поэтому следует считать, что липопротенды в действительности по подвижности принадлежат почти исключительно к группе $\alpha\beta$ -глобулинов.

Фракционирование в ультрацентрифуге приводит к появлению значительно большего числа фракций [13]. Применение метода флотации по Гофману [14—15] показывает, что в группе с одной и той же электрофоретической подвижностью (α или β) всегда можно выделить значительное число фракций, отличающихся разным удельным весом и разными частичными («молекулярными») характеристиками. Это, очевидно, может быть только в том случае, когда количество белков, принимающих участие в образовании липопротендов, невелико. Например, можно было допустить существование только двух белков: одного, имеющего подвижность α -глобулина и другого — β -глобулина [16], различие в молекулярных размерах, находимых с помощью ультрацентрифуги, в свою очередь можно объяснить разным составом липидной мицеллы.

На основании изучения в ультрацентрифуге [17] липопротенды разделяют на группу высокой плотности ($d > 1,063$) и группу, имеющую низкую плотность ($d < 1,063$). По электрофоретической подвижности они относятся соответственно к α - и β -липопротеидам, что также находится в соответствии с данными химического анализа: β -липопротеиды содержат больше липидов и поэтому имеют меньший удельный вес.

На рис. 1 представлена трехмерная диаграмма, составленная Кункелем и Тройтманом [18]. Она получена следующим путем: фракции белков выделены при электрофорезе на крахмале или поливиниловой смоле и в последую-

щем проведено исследование в аналитической ультрацентрифуге в растворе с плотностью 1,2. Так были получены две фракции α_1 с плотностью 1,075 и 1,140; один α_2 - и один β_1 -липопротеиды с плотностью соответственно 1,000 и 1,035. Каждая группа, как сказано выше, в свою очередь может быть разделена на подфракции, количество которых тем больше, чем более совершенен метод флотации. В настоящее время известно около 30 видов липопротеидов. Линдгрэн предполагает, что усовершенствование метода флотации позволит выделить сотни липопротеидов разной плотности [17].

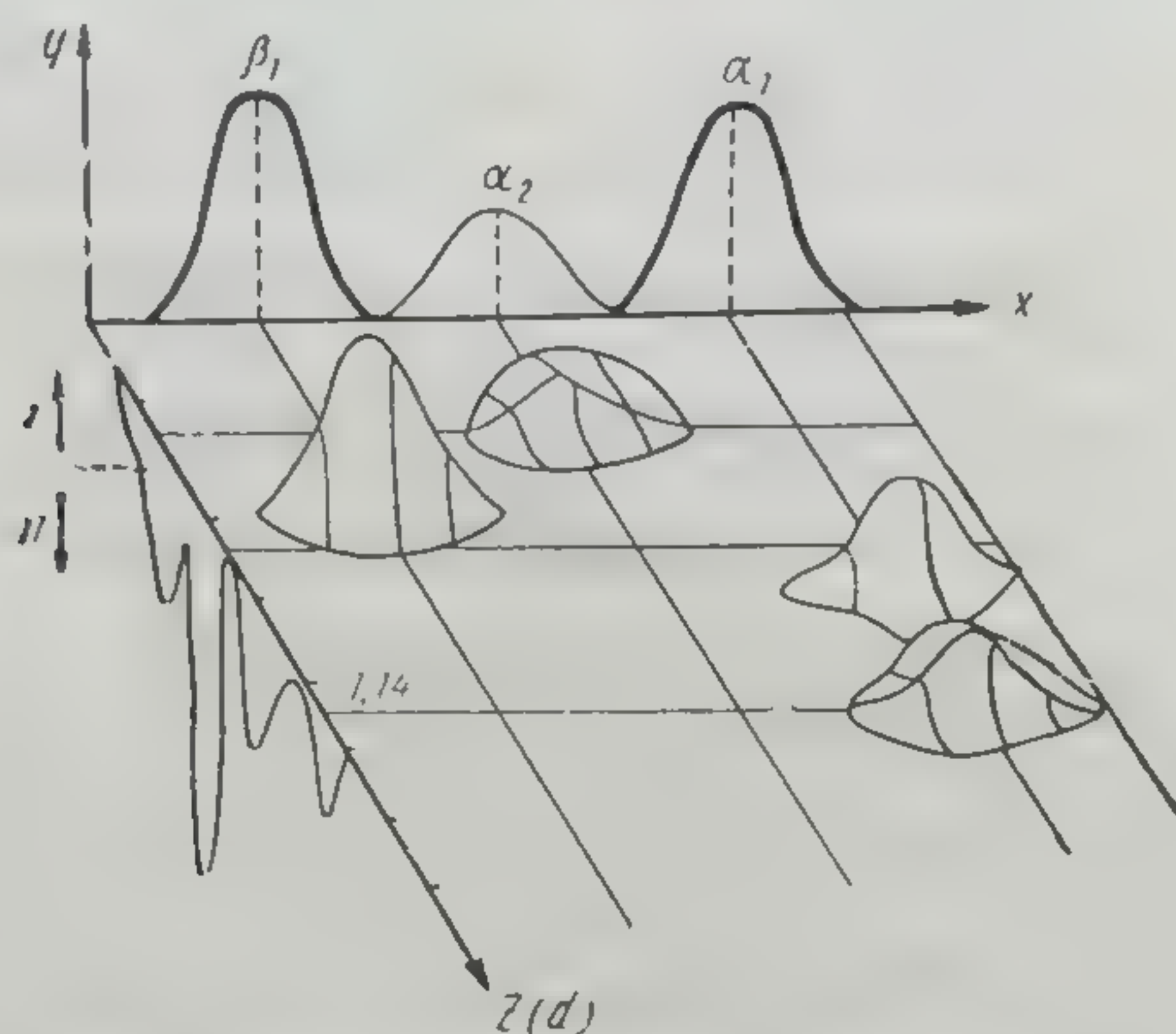


Рис. 1. Соотношение данных электрофореза и ультрацентрифугирования.

Y — концентрация; X — подвижность при электрофорезе на крахмальном блоке (α , β — соответствующие глобулины); Z — подвижность в гравитационном поле. I — ЛП легче плазмы; II — тяжелее плазмы.

Гофман предложил обозначать липопротеиды высокой плотности буквами HLD. В препаративной ультрацентрифуге выделено [19] и подробно охарактеризовано три подобных вещества: HLD_1 ¹ — имеет плотность 1,055, HLD_2 с плотностью 1,075, молекулярным весом $4 \cdot 10^5$ и размером $90 \times 365 \text{ \AA}$ и HLD_3 с плотностью 1,145, молекулярным весом $1,75 \times 10^5$ и размером $40 \times 130 \text{ \AA}$. Липидная часть этих белков легко экстрагируется смесью эфира и спирта. Хотя в большинстве случаев белок при этом денатурируется [20], была получена белковая часть α -липопротеидов, сохранившая способность растворяться в воде. Данный белок не содержит сульфгидрильных групп.

α -липопротеиды. Шор [21] провел детальное исследование индивидуальных фракций двух липопротеидов, входящих в группу α . Один из них имеет $d=1,093$ и молекулярный вес белковой компоненты 95 000 и другой $d=1,149$ и молекулярный вес 190 000. Данные по аминокислотному составу приведены в табл. 1.

Как видно из приведенных цифр, оба белка имеют идентичный аминокислотный состав и отличаются только тем, что в первый из липопротеидов входит одна полипептидная цепь, а в другой — две. Конечные аминокислоты оказались также одинаковыми (N-аспарагиновая кислота и C-треонин). Эти факты полностью подтверждают предположение о том, что белковая

¹ Ввиду нестабильности этот липопротеид подробно не был охарактеризован.

Таблица 1
Аминокислотный состав липопротеидов, альбумина и
γ-глобулина сыворотки человека

Аминокислоты	Липопротеиды ² (21)		Альбумин [22]	γ-глобулин [22]
	d=1,093	d=1,149		
Серин	51	49	32	108,8
Треонин	45	47	39	70,6
Глицин	32	32	22	56,0
Аланин	60	61	—	—
Валин	52	51	65	83,0
Лейцин	128	126	84	71,0
Фенилаланин	27	26	48	27,9
Лизин	69	70	84	55,5
Тирозин	18	17	26	37,6
Аспарагиновая кислота	59	60	67	66,2
Глютаминовая кислота	124	125	64	80,4
Гистидин	16	16	23	16,1
Пролин	34	33	45	70,5
Аргинин	38	40	36	27,9
Цистеин, цистин	25 ¹	25 ¹	6,7	25,7
Метионин	0	0	8,4	7,3
Триптофан	Не опре- делен		Сле- ды	14,2

¹ Определены как цистеиновая кислота.

² Для липопротеидов цифры показывают число в 95 000 г белка; для альбумина — в 100 000 г белка (пересчитано нами); для γ-глобулина — также в 100 000 г белка.

компонента липопротеидов, входящих в группу α-липопротеидов, несмотря на различие в молекулярных характеристиках комплексов, представлена одним и тем же белком. Из приведенных данных видно, что оба липопротеида имеют аминокислотный состав, отличающийся как от альбумина, так и от γ-глобулина. Если стоять на точке зрения возможности трансформации альбумина в белки, подобные α-глобулину [23], то следует признать участие в такой трансформации или аминокислот, или специфических полипептидов, или ухода части белковой компоненты при извлечении липидов [24] в процессе анализа. Онкли допускает возможность обогащения альбумина некоторыми аминокислотами [25].

β-липопротеиды. При исследовании в ультрацентрифуге было показано, что эти комплексы относятся к группе с плотностью 1,019—1,063. Методом флотации они также могут быть подразделены на большее число компонентов, отличающихся по удельным и молекулярным весам. Разработаны условия, позволяющие выделять, по-видимому, индивидуальные β-липопротеиды. Шор [21] получил белок с плотностью 1,029, который имеет в качестве концевых кислот N-глютаминовую кислоту и C-серин. Белок содержит две полипептидные цепи с общим молекулярным весом 380 000. Эйвиген [26] считает, что основная масса белков этой группы имеет концевую глютаминовую кислоту, а α-липопротеиды — аспарагиновую. Здесь же имеются и белки другого строения. Так, Шор в цитированной работе указывает на выделение липопротеида (1,002—1,006) с молекулярным весом 120 000, имеющим концевые N-серин и C-аланин. Впрочем, следует допустить возмож-

ность, что в процессе комплексообразования конечные аминокислоты могут меняться при неизменном общем аминокислотном составе.

β -липопротеиды являются типичными эвглобулинами. Кроме того, они обладают способностью специфически высаживаться некоторыми полиэлектролитами. Онклей и др. [27] использовали сульфат декстрана. Бурштейн и Самайт [28] для той же цели применили, кроме декстрана, сульфарсенолан в присутствии CaCl_2 . Способностью осаждать β -глобулины обладает также гепарин, сульфированный пектин и сульфированный амилопектин.

На этой основе были разработаны специфические методы препаративного получения и количественного определения β -липопротеидов [29—32].

Липопротеиды этой группы легко разрушаются при всякой потере воды и не выносят даже лиофилизации.

Наряду с постоянством белкового состава липидный состав липопротеидов обнаруживает значительно большее разнообразие, подчиняющееся, однако, вполне определенным закономерностям.

В табл. 2 даны сведения о липидном составе 5 групп липопротеидов.

Таблица 2

Химический состав липопротеидов плазмы человека [33]

Плотность при 25°	S_f	Электрофоретическая группа	Концентрация mg %	% к общему количеству				
				П	ФЛ	Х	ЭХ	ТГ
0,94	—	Разн.	Разн.	2	7	2	6	83
0,98	400—10	d_1, α_2	150	9	18	7	15	50
1,03	10—2	β_1	320	21	22	8	38	10
1,09	—1	α_1'	80	33	29	7	23	8
1,14	—2	α_1	380	57	21	3	14	5

Условные обозначения: П — пептиды; ФЛ — фосфолипиды; Х — холестерин; ЭХ — эфиры холестерина; ТГ — триглицериды; S_f — константа флотации.

Группа, имеющая плотность 0,94, относится к хиломикронам. По нашим наблюдениям, подвижность хиломикронов зависит от их концентрации в крови. При невысокой концентрации они связаны с β -глобулинами, при повышении их количества (например, на высоте всасывания) хиломикроны связываются последовательно с α -глобулинами и альбуминами (см. ниже).

Как видно из приведенных данных, удельный вес липопротеидов и S_f являются функцией их химического состава: чем больше константа флотации, тем меньше содержание пептидов. С другой стороны, чем меньше содержание фосфатидов, тем меньше степень дисперсности. Аналогичные результаты получаются в опытах с искусственным приготовлением золь липидов.

Коллоидный раствор, приготовленный из смеси лецитина, холестерина и триглицеридов, дает тем больший эффект Тиндаля, чем меньше относительное содержание фосфатида (собственные наблюдения).

В последнее время сообщены данные, показывающие, что разные липопротеидные классы, отличающиеся по плотности, характеризуются специфическим составом липидов.

Основная часть фосфолипидов представлена кефалином, лецитином и сфингомиелином. Филипс [34] нашел, что фосфолипиды плазмы содержат до 7% лизолецитина. Около 1—2% фосфолипидов приходится на плазмалоген инозитол фосфатиды и фосфатидилсерин. Нельсон и Фриман [35], используя хроматографию на колонке из силикагеля, газовую хроматографию

жирных кислот и инфракрасную спектрофотометрию, провели подробный анализ состава фосфатидов и жирных кислот, входящих в разные по плотности классы липопроотеидов. Данные цитированных авторов приведены в табл. 3.

Таблица 3
Состав фосфатидов разных групп
липопротеидов [35]

Класс липопротеидов	Среднее содержание в %		
	кефалин	лецитин	сфин- гомие- лин
S _f 20—40	7,7	74,0	18,3
S _f 0—20	5,6	68,8	25,6
HLD ₁₊₂	7,4	80,8	11,8

Как видно из табл. 3, наиболее богата лецитином группа HLD₁₊₂.

Приведенные данные в отношении липидного состава показывают, что последний варьирует более широко по сравнению с белковой частью; иными словами, липопроотеидов, отличающихся белковой частью, в основном только две группы (α и β), в то время как имеющих разницу в липидном составе значительно больше [17]. Такого рода факты свидетельствуют о разнообразии обмена липидной части липопроотеидов.

МАКРОСТРУКТУРА ЛИПОПРОТЕИДОВ

Вопросы строения липопроотеидов могут быть рассмотрены в двух аспектах:

1) в направлении изучения химических и физических связей между полипептидной цепью и молекулой липида;

2) в направлении изучения строения мицеллы как целого, включая изучение пространственного расположения пептидной и липидной частей, а также состояние белков в комплексе.

Для удобства мы обозначаем аспекты первой категории как вопросы микро- и второй — как макроструктура липопроотеидов. Естественно, что оба типа задач могут решаться только совместно.

Типы связей между полипептидной цепочкой и гидрофобной липидной частицей были широко рассмотрены еще в 1949 г. на специальной конференции, посвященной липопроотеидам [36—38]. Анализируя данные, представленные тогда и позднее, можно прийти к выводу, что рассматриваемая связь в липопроотеидах плазмы крови осуществляется главным образом за счет слабых сил: солевые связи, водородные, силы ван дер Ваальса, в то время как ковалентные связи встречаются редко. Иногда пользуются более общим термином: адсорбционные связи, или связи активированной адсорбции.

Вопрос о липопроотеидах тканей решить сложнее, поскольку случаи ковалентных связей там встречаются чаще, а связи «адсорбционного» типа могут появиться как артефакт в процессе выделения того или иного липопроотеида.

Липопроотеиды плазмы крови, по-видимому, целиком относятся к типу комплексов «адсорбционного типа», поскольку липиды могут быть полностью извлечены обработкой нейтральными растворителями при низкой температуре [7] или при добавлении к эфиру поверхностно активных веществ [19, 39].

Одним из первых о строении липопроотеидов высказал свое мнение Машбеф (см. обзор [2]). Согласно его утверждению, эти комплексы представляют

собой коллоидные частицы, в структуре которых молекулы липидов переслоены молекулами белка. При этом гидрофобные части полипептидных цепей и липидов ассоциируются вместе и располагаются во внутренних частях общей мицеллы, а гидрофильная поверхность представляет собой мозаику различных ионных и полярных групп, принадлежащих как липидам, так и белку. Позже, развивая этот взгляд, Онкли [40] отнес липопротейды к категории миелиновых структур, отметив большое значение связанной воды в поддержании целостности липопротейдной мицеллы. Различные варианты этих взглядов неоднократно обсуждались [2, 36, 38, 40, 41]. Общим для всех теорий является признание внутренней структуры (макроструктуры), определяющей сам факт существования липопротейдов.

Бугенберг де Йонг [42] показал, что возникновение подобных структур можно наблюдать и в модельных опытах при взаимодействии коацерватов и липидов. Вторая возможность связана с представлением о независимом существовании липидной коллоидной мицеллы и белковой компоненты, которая выступает в роли фактора коллоидно-химической защиты.

Тот факт, что липиды имеют подвижность β -глобулина, позволил в свое время допустить, что белок находится на поверхности липидной глобулы [41, 43, 44]. В пользу этого предположения можно привести следующие соображения.

1. Г. В. Троицким [45] доказано, что белки крови легко адсорбируются на поверхности липидных частиц. При этом в случае таких типично гидрофобных коллоидов, как каротин или витамин А, образуется очень прочный гидрофильный комплекс, обладающий всеми свойствами белка (растворимость, высаживание солями, электрофоретическая подвижность, способность к денатурации). Ясно, что в данном случае наблюдался типичный ярко выраженный пример коллоидно-химической защиты. Белки сыворотки обладают способностью вытеснять друг друга из этого комплекса. Причем, по способности вытеснения их можно было расположить в следующий ряд: $\beta > \alpha > \gamma$ альб. Позже Кобозев [46] показал, что для некоторых коллоидов следует принимать во внимание несколько другую последовательность: $\beta > \alpha > \text{альб.} > \gamma$ -глобулин. Однако оба автора получили одинаковый результат: наибольшую адсорбционную активность имели β - и α -глобулины.

Было также показано, что при добавлении возрастающих концентраций эмульсии триглицеридов, каротина или других коллоидных растворов они последовательно связывались в соответствии с приведенным рядом [41, 46]. Аналогичные наблюдения сделаны и на липемических сыворотках: при умеренно выраженной липемии основная масса хиломикронов при электрофорезе обнаруживалась в составе β -глобулинов [43]. При росте концентрации хиломикроны связывались последовательно с α -глобулином и альбумином. Аналогичную последовательность можно наблюдать при введении в кровь других коллоидов, например при внутреннем введении раствора конго-красного [46]. Таким образом, не оставалось сомнения, что по крайней мере для хиломикронов γ отношения с белком находятся в соответствии с приведенным выше адсорбционным рядом.

Количественные отношения между белком и липидом (см. табл. 1) дают возможность допустить, что поверхность липидной глобулы неполностью покрыта белком. Модельные опыты также позволяют сделать это допущение [46].

2. Эйвиген [47] провел исследования по влиянию экстракции липидов на их поведение в ультрацентрифуге. Автором показано, что при экстракции эфиром липопротейдов низкой плотности ($d=1,019-1,063$) их электрофоретическая подвижность не изменяется и остается равной β -глобулинам ($U=2,6 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \text{ вольт}^{-1} \text{ сек.}^{-1}$), но плотность становится более высокой ($d=1,37$). Этот факт легко объяснить, поскольку удаление липидов должно повысить удельный вес остатка, который теперь содержит больше белка. Сле-

в ре...
нат...
так и по...
лодным...
Мож...
липопро...
кой пло...
а может...
дов от...
тракци...
Лип...
покрыт...
протейд...
Изв...
способность...
липаза...
попрот...
ность л...
зывают...
щего ф...
на три...
500 ра...
гепари...
сацин...
дов [50...
фермен...
А...
лочку...
точку...
если м...
С...
ных ф...
в β -ли...
Т...
вид. Р...
самог...
торая...
соеди...
нейш...
и гет...
нение...
выст...
в рус...
сона...
шая...
пото...
нить...
при...
ся в...
ран...
рин...
тур...
экс...

дует, однако, отметить, что липопротеиды высокой плотности, получившиеся в результате такой обработки, не идентичны (как полагает Линдгрэн)[17] нативным HLD_{1+2} , поскольку как по электрофоретической подвижности, так и по иммунологическим характеристикам они остаются идентичными исходным липопротеидам низкой плотности [49].

Можно также отметить, что известный факт увеличения количества липопротеидов высокой плотности при диализе за счет липопротеидов низкой плотности не является доказательством существования общих мицелл, а может быть объяснен их неустойчивостью. В процессе диализа часть липидов отщепляется, т. е. происходит процесс, аналогичный эфирной экстракции.

Линдгрэн [17] считает, что поверхностное расположение белков и неполное покрытие ими поверхности липидной мицеллы объясняют действие липопротеидной липазы (осветляющего фактора).

Известно, что при введении в кровь гепарина плазма приобретает способность осветлять липемическую сыворотку [13]. При этом в кровь поступает липаза, обладающая способностью расщеплять триглицериды в составе липопротеида, освобождается некоторое количество жирных кислот и дисперсность липопротеидов увеличивается. Освободившиеся жирные кислоты связываются альбумином, который проявляет свойства активатора осветляющего фактора. Липопротеид — липаза может быть очищена при адсорбции на трифосфате кальция [49], в результате чего ее активность увеличивается в 500 раз. Корн [50, 51] полагает, что в состав липопротеидной липазы входит гепариноподобный углевод. Действие липазы состоит из двух стадий: фиксации фермента на липопротеидах и последующего гидролиза триглицеридов [50]. Фермент плохо действует на чистые жиры. Схема действия этого фермента приведена на рис. 2.

Автор допускает, что липопротеиды высокой плотности составляют оболочку липопротеидов низкой плотности. Однако, как сказано выше, такую точку зрения нельзя считать доказанной. Характер рисунка не изменяется, если мы вместо HLD вставим белки другой природы.

Суммируя изложенное, можно сделать вывод, что большинство известных фактов говорит в пользу теории поверхностного расположения белка в β -липопротеидах (см. рис. 2).

Таким образом, генез β -липопротеидов имеет примерно следующий вид. В организме образуется значительное количество смешанных липидов самого разнообразного состава и дисперсности. Та категория мицелл, которая богата триглицеридами и холестерином и бедна фосфатидами, присоединяет по своей поверхности β -глобулин определенного состава и в дальнейшем существует как группа веществ, гомогенная в электрическом поле и гетерогенная в гравитационном. Легче всего предположить, что присоединение белка осуществляется в том месте, где образуется мицелла и белок выступает в роли эмульгатора. Однако возможно и образование комплексов в русле крови. В пользу такого взгляда говорят опыты Родбелл и Фредриксона [52—54], показавшие, что белковая оболочка хиломикронов, образующаяся в клетках кишечника, вначале имеет специфический белок, который потом сравнительно легко обменивается на белки плазмы (интересно сравнить с вытеснительной адсорбцией, описанной выше). Эйвиген показал, что при инкубировании плазмы с холестерином + целит 545 холестерин включается в состав липопротеидов в довольно значительных количествах [55]. Еще ранее были представлены данные, которые демонстрируют обмен холестерином между эритроцитами и липопротеидами [40].

Что касается липопротеидов высокой плотности, то вопрос об их структуре более сложен. Здесь липидная часть удерживается сильнее и простая экстракция эфиром не приводит к значительной потере липидов [47]. Экстрак-

ция смесью эфира и алкоголя приводит к денатурационным явлениям, которые могут быть зарегистрированы по резкому увеличению отрицательной оптической активности и уменьшению электрофоретической подвижности. В связи с этим следует отметить, что α -липопротеиды богаты фосфатидами, которые, видимо, связываются с белком более активно, чем триглицериды и холестерин. Ранее [13] установлено, что связывание альбумина с некото-

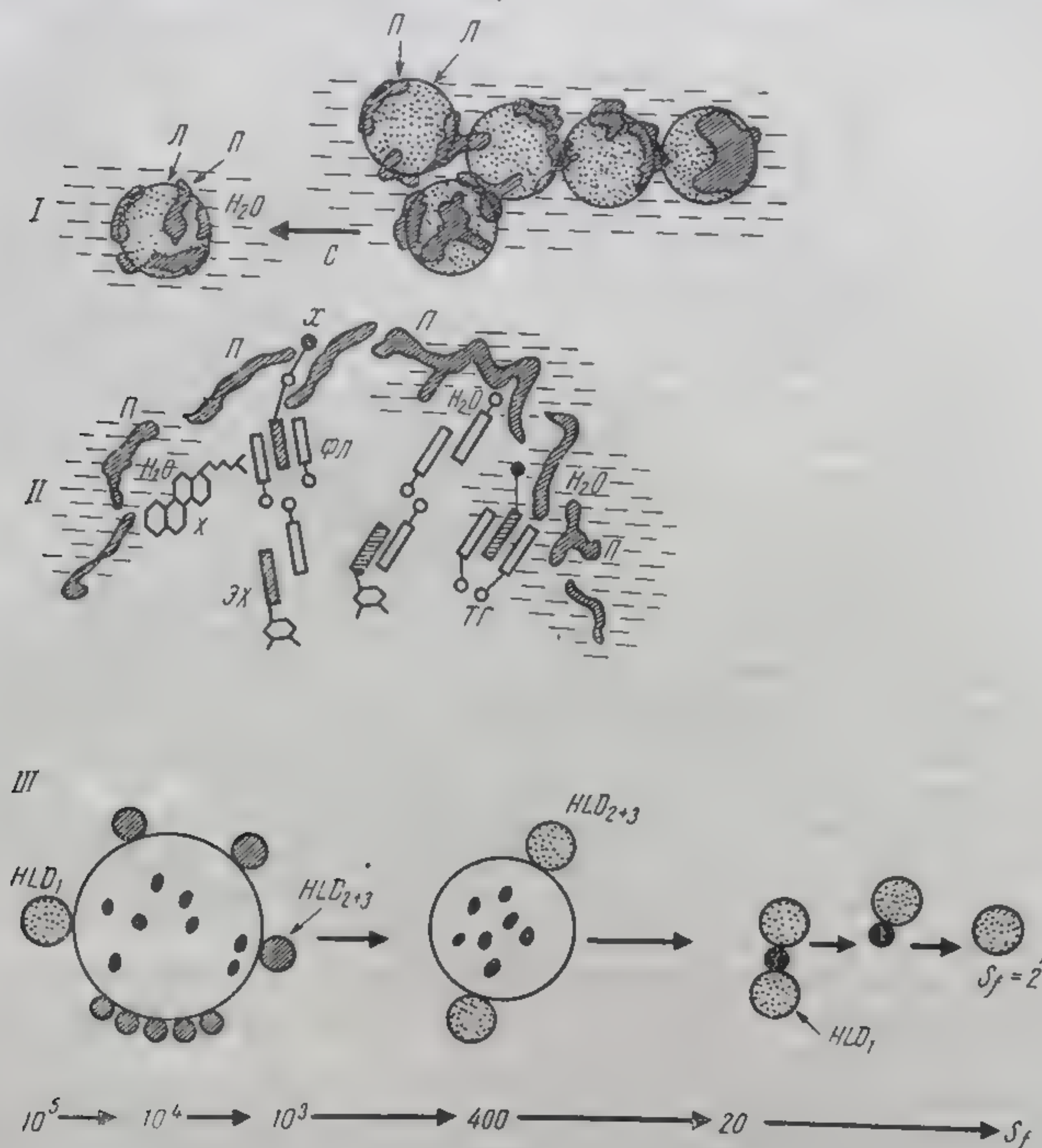


Рис. 2. Гипотетические схемы строения липопротеидов.

Л — липиды; П — полипептидные цепи; Х — холестерин; ЭХ — эфиры холестерина; ФЛ — фосфолипиды; ТГ — триглицериды (остальные обозначения см. в тексте). I — обозначено поверхностное расположение полипептидных цепей на липидной мицелле; II — схема составлена по Анфинсену [89]; III — схема составлена по Линдгрену [17]; здесь показан распад ЛП под влиянием ЛП-липазы.

рыми липидами (например, цитралем или окисленными формами витамина А) приводит к появлению аналогов α -липопротеидов; при этом белок и липид связаны ковалентными связями. По-видимому, и фосфатиды связаны с белком не только солевыми связями. Искусственные комплексы альбумина и лецитина [56] существуют только в области рН 7 и при изменении реакции среды диссоциируют, как и следовало ожидать для солевых связей. Можно думать, что в состав α -липопротеидов входят альдегидные или эпоксидные формы липидов, которые более прочно связываются с белком [57].

Следует, впрочем, отметить, что доказательства, основанные на легкости экстрагирования, малоубедительны. Например, из чистого водно-коллоидного раствора каротин или холестерин никогда полностью не извлекаются эфиром. Если бы в растворе был белок, то могло бы возникнуть предпо-

ложение о связи с ним частицы липида. По-видимому, в данном случае определяющим является статистическое распределение по величине мицелл: легче экстрагируются более крупные мицеллы, вероятность коагуляции которых больше и прочность водных оболочек на поверхности которых меньше. Нетрудно видеть, что и в липопротеидах имеются подобные взаимоотношения: липидная часть легко извлекается из крупных мицелл липопротеидов. При добавлении поверхностно активного вещества в качестве агента, облегчающего экстракцию и разрушающего поверхностный слой естественного стабилизатора (воды или оводненного белка), решающим является прочность связи стабилизатора с липидом. Эти соображения хорошо согла-

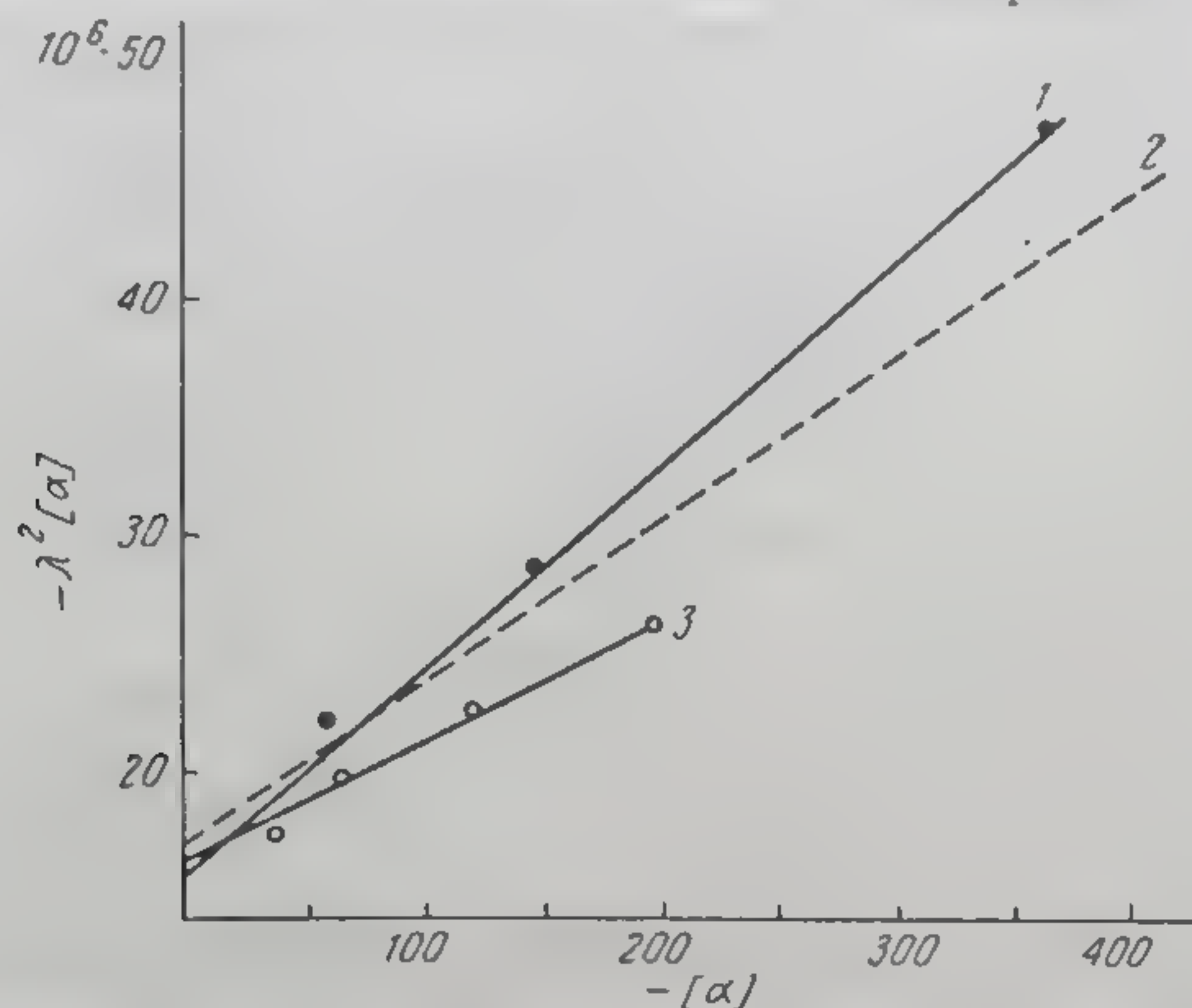


Рис. 3. Дисперсия оптической активности белков плазмы крови.

Для α -глобулина приведена только λ_0 . Обозначения на ординатах и абсциссах соответствуют форме выпрямления уравнения Друде $[\alpha] = \frac{K}{\lambda^2 - \lambda_0^2}$ [63], где $[\alpha]$ — оптическое вращение при длине волны λ ; K и λ_0 — константы.

суются с тем фактом, что введение более активных в адсорбционном отношении высших спиртов или детергентов позволяет полностью извлечь липиды из α -липопротеидов, хотя в большинстве случаев процесс связан с денатурацией белка [13,47]. Таким образом, вопрос о строении α -липопротеидов является до настоящего времени неясным.

Легкая денатурируемость белка в липопротеидах наводит на мысль, что белковая компонента в липопротеидах находится в метастабильном состоянии, близком к денатурации. Возможно, что это связано с расположением белка на поверхности раздела. В связи с этим представляют интерес термодинамические соображения, согласно которым [58–60] процесс комплексообразования нарушает вторичную и третичную структуру белка и делает более вероятной конфигурацию статистического клубка. Процесс комплексообразования в данном случае можно рассматривать как незавершенную денатурацию. Г. А. Деборин [57] показал, что в модельных опытах стеролы являются факторами, предохраняющими белок от денатурации на поверхности раздела. Таким образом, удаление липидов как факторов, стабилизирующих белок, приводит к завершению денатурации.

В пользу высказанной точки зрения можно привести следующие соображения.

1. Электрофоретическая характеристика белковой части липопротеидов близка к модифицированным белкам, полученным при денатурирующей обработке альбумина и α -глобулина [23].

2. Белки из группы α - и β -глобулинов по величине ближе к денатурированным формам (рис. 3).

На рис. 3 проиллюстрированы наши эксперименты по изучению дисперсии оптического вращения альбумина и псевдоглобулинов после обработки их серным эфиром. Исследования проведены в фотоэлектрическом поляриметре с фотоумножителем ФЭУ-17 (или ФЭУ-22 для длинных волн), соединенным с круговым поляриметром, позволяющим отсчитывать угол с точностью до 30 секунд. В качестве источника света была применена ртутная дуга сверхвысокого давления. Применение фотоумножителя позволило проводить измерения в ближнем ультрафиолете с использованием ртутной линии $\lambda = 365 \text{ м}\mu$ с обычной поляриметрической оптикой и стеклянными поляриметрическими трубками. Отсчеты проводились методом симметричных углов с ошибкой, не превышающей $0,02^\circ$, что в данной серии экспериментов соответствовало ошибке в определении $[\alpha]$ в $\pm 2,0^\circ$. В последующем аппаратура была усовершенствована введением электронного осциллографа и фарадеевской ячейки для модуляции света, что позволило проводить отсчеты с точностью до 0,008 и соответственно $[\alpha] = M \pm 0,5^\circ$.

Мы исследовали альбумин сыворотки быка, полученный методом выкалывания и очищенный от пигментов путем фильтрования через фосфат кальция, фракцию псевдоглобулинов и α -глобулин, выделенный в очищенном виде путем электрофореза на крахмальном блоке. Сыворотку перед ее разделением на фракции экстрагировали смесью эфира и спирта при -15° . После такой обработки электрофоретическая подвижность фракций не изменилась.

Кривые на рис. 3 построены по методу, предложенному Доти [61]. Как видно из хода прямых, исследованные препараты дают дисперсию, подчиняющуюся одночленному уравнению Друде. Полученные нами цифры для альбумина очень близки данным Доти [61] и Джиргенсон [62].

λ_0 , вычисленная нами, совпадает с цифрами цитированных авторов. Для псевдоглобулина и α -глобулина получены более низкие цифры и в пределах точности нашей спектрополяриметрической установки существенно отличны от соответствующих цифр альбумина. В соответствии с предположением Линдерштрот-Ланга и Шелмана [63] значение λ_0 , меньшее $245 \text{ м}\mu$, соответствует белкам, имеющим малую долю α -спиралей и значительный процент структур, находящихся в состоянии статистического клубка. Хотя данный метод определения доли α -спиралей и неточен, а взятые для исследования белки не являются чистыми липопротеидами, тем не менее результаты говорят в пользу предположения, что белок липопротеидов находится в состоянии, близком денатурации. Это согласуется с тем, что вся группа α -, β -глобулинов представлена комплексами (глюцидными или липидными).

РОЛЬ БЕЛКА КАК ФАКТОРА СТАБИЛИЗАЦИИ ЛИПОПРОТЕИДОВ

Установлено, что суммарные белки сыворотки крови не обладают способностью стабилизировать коллоидные растворы холестерина [5]. Это наблюдение находилось в противоречии с основным утверждением о физиологическом смысле существования липопротеидов как переносчиков липидов. В работе, цитированной выше, сделано предположение, что несоответствие модельных опытов физиологическим наблюдениям объясняется особым типом связи холестерина с белком. Впоследствии [46], однако, на различных гидрофобных коллоидах было показано, что белки крови по их стабилизирующему действию обладают разными свойствами: альбумин является

стабилизатором гидрофобных коллоидов, в том числе и холестерина; γ -глобулин — сенсibilизатором (т. е. вызывает их коагуляцию), а α - и β -глобулины имеют только слабо выраженные свойства стабилизатора. Аналогичные наблюдения были сделаны Л. С. Тарасовой с золью холестерина [64]. Таким образом, белки, которые в основном отвечают за устойчивость холестерина и обладают наибольшим адсорбционным сродством к нему (см. стр. 40), вместе с тем являются плохими стабилизаторами. Не менее важно существование в крови сенсibilизаторов коллоидного холестерина. Нетрудно видеть, что подобный факт имеет первостепенное значение для патогенеза атеросклероза: если в крови нарастает количество γ -глобулинов, то возможно спонтанное выпадение холестерина на стенках артерий. Известно, что выпадение холестерина рассматривается многими авторами как «пусковой» момент в развитии атеросклероза.

Следует отметить, что С. В. Недзвецкий [65, 66] еще в 1947 г. показал, что при расщеплении липопroteидов путем осаждения белка сульфатом серебра почти весь холестерин остается в растворе не связанный с белком. Г. В. Кобозев повторил эти опыты, однако нашел, что после обработки Ag_2SO_4 в надосадочной жидкости остается небольшое количество белков, дающих положительную биуретовую реакцию и являющихся, по-видимому, гликопротеидами. Кроме того, оказалось, что коагуляция белка теплом приводит примерно к такому же эффекту [46]. Эти опыты навели на мысль более подробно исследовать влияние гликопротеидных фракций. С указанной целью из разных белков сыворотки крови были выделены [67] гликопротеидные компоненты и затем проверено их влияние на устойчивость зольей холестерина. Оказалось, что гликопротеидная фракция, выделенная из «альбумина», полученного высаливанием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, хорошо защищает золи холестерина от коагуляции электролитами, в то время как гликопротеид, выделенный тем же способом из γ -глобулина, коагулирует золь холестерина и витамина D_2 даже в отсутствие электролитов [68].

Приведенные факты находятся в соответствии с наблюдением о специфическом влиянии сульфированных полисахаридов, в частности гепарина, на устойчивость β -липопroteида. Изложенное также показывает, что нативные гликопротеидные плазмы играют важную роль в формировании липопroteидов и, возможно, являются участниками общей мицеллы липогликопротеидов [69, 70, 71]. С этой точки зрения структурные схемы, приведенные на рис. 2, следует считать неполными.

Интерес к взаимоотношению глико- и липопroteидов возникает также при анализе данных опытов по элементарному атеросклерозу у кроликов. Ансельм и др. [72] наблюдали при этом повышение концентрации серомукоидов.

На рис. 4 приведены результаты опытов Л. С. Тарасовой при исследовании распределения гликопротеидов в белках сыворотки крови при кормлении животных холестерином. В стадии, когда начинает развиваться атеросклероз, имеет место уменьшение гликопротеидов, связанных с альбуми-

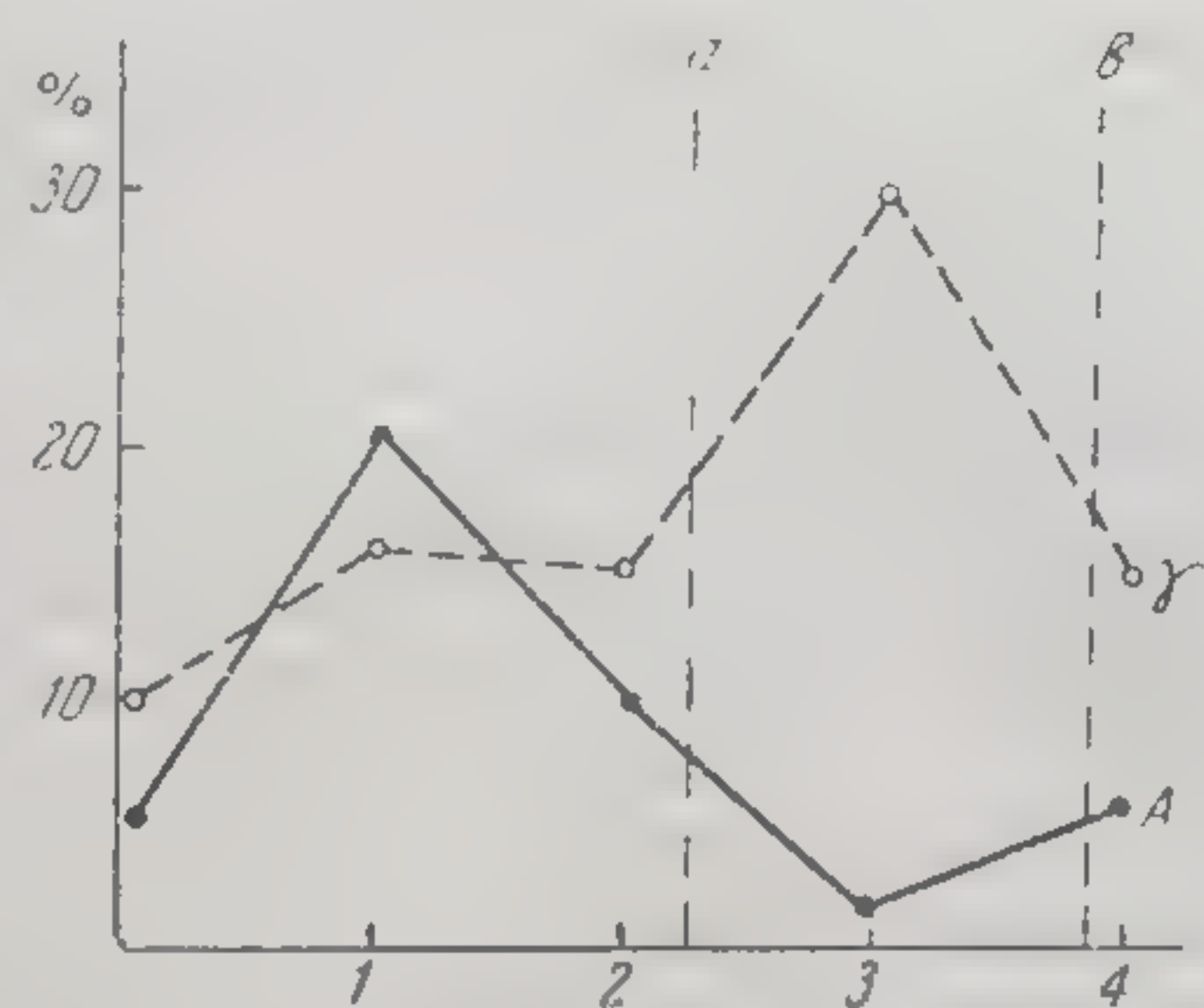


Рис. 4. Изменение в распределении гликопротеидов между альбумином и γ -глобулином в зависимости от времени кормления кроликов холестерином.

A — альбумин, γ — γ -глобулин; ординаты — % гликопротеидов по отношению к их общему количеству во всех белках плазмы; абсциссы — время в месяцах; а — б — период развития атеросклероза.

ном («факторов стабилизации»), и увеличение гликопротеидов, связанных с γ -глобулином, являющихся «факторами коагуляции» холестерина.

Эти эксперименты позволяют думать, что при развитии атеросклероза имеет место нарушение не только липидного, но и углеводного обмена (мукополисахаридоз). Это особенно интересно ввиду того, что «холестериновая этиология» алиментарного склероза не вызывает сомнения.

ОБМЕН ЛИПОПРОТЕИДОВ

Обмен липопротенидов изучался довольно подробно как в условиях нормы, так и разнообразной патологии. По этому вопросу существуют довольно подробные сводки [73, 74, 76]. Мы остановимся только на некоторых аспектах проблемы.

Оякли [25], изучая динамику липопротенидов у людей, применил метод меченых атомов. С этой целью липопротениды, имеющие плотность 0,98 и 1,03, йодировали: было показано, что примененная методика позволяет вводить J^{131} в пептидную часть. Небольшие количества йодированных липопротенидов вводили в кровь. В последующем через определенные промежутки времени из крови методом ультрацентрифугирования выделяли четыре фракции липопротенидов: хиломикроны, β -липопротениды (0,98 и 1,03) и смешанные α -липопротениды. Если вводили липопротениды 0,98, то метка быстро появлялась в других β -липопротенидах (1,03). Концентрация меченого J^{131} достигала максимума через 15 часов, когда 35% активности находилось в этой фракции. Концентрация меченых 0,98 липопротенидов быстро уменьшалась, достигая значения в 2% через 2 дня. Расчет показывает, что полупериод распада легких липопротенидов менее одного дня. Это, следовательно, наиболее активная в метаболическом отношении фракция белков плазмы. Липопротениды с плотностью 1,03 имеют полупериод распада, равный 3—4 дням. Введение меченых β -липопротенидов 1,03 показало, что они не превращаются в β -липопротениды с плотностью 0,98. Таким образом, возможен, видимо, только такой путь превращения, который приводит к дезагрегации липопротенидов, поскольку молекулярные размеры 0,98 липопротенидов больше, чем 1,03 липопротенидов. Введение α -липопротенидов не приводило к переходу метки на β -липопротениды, что говорит о неидентичности белковых компонентов обоих белков. Метка по липидной части показывает, что и холестерин, и фосфатиды находятся в динамическом равновесии с соответствующими фракциями тканей и эритроцитов и что равновесие устанавливается в течение нескольких часов [40, 77]. Эти опыты говорят в пользу транспортной роли липопротенидов.

Значительная метаболическая активность липопротенидов может быть показана также в опытах по кровопусканию. Даже небольшие потери крови у людей и животных приводят к увеличению концентрации липопротенидов [78]. После ежедневных небольших кровопусканий у крыс отмечается увеличение концентрации α_2 - и β -фракций липопротенидов, в то время как содержание α_1 -липопротенидов понижается. Одновременно происходит увеличение содержания холестерина, фосфолипидов и общих липидов. Липопротениды относительно обогащаются фосфатидами. Если же одновременно вводить гепарин, то содержание липидных компонентов в липопротенидах уменьшается. При изучении регенерации белков плазмы крови методом электрофореза после массивных кровопусканий ряд авторов наблюдал наиболее быстрое восстановление в крови содержания α - и β -глобулинов. Восстановление идет даже быстрее, чем регенерация общего объема крови за счет поступления воды, несмотря на то что в опытах вводили солевой раствор, в два раза превышающий по объему количество взятой крови [79]. Экспериментами, проведенными в нашей лаборатории показано, что это восстановление

касается в основном небелковых компонентов белков плазмы, в том числе и липидной части.

На рис. 5 приведены данные одной серии опытов, проведенных на нормальных кроликах и кроликах с алиментарной гиперхолестеринемией. Как видно из представленных кривых, содержание α - и β -глобулинов в норме восстанавливается очень быстро и скоро начинает ее превышать в 2—3 раза. Особенно резко происходит изменение в содержании этих белков у гиперхолестеринемичных кроликов (кривые II, IV). Большинство авторов изу-

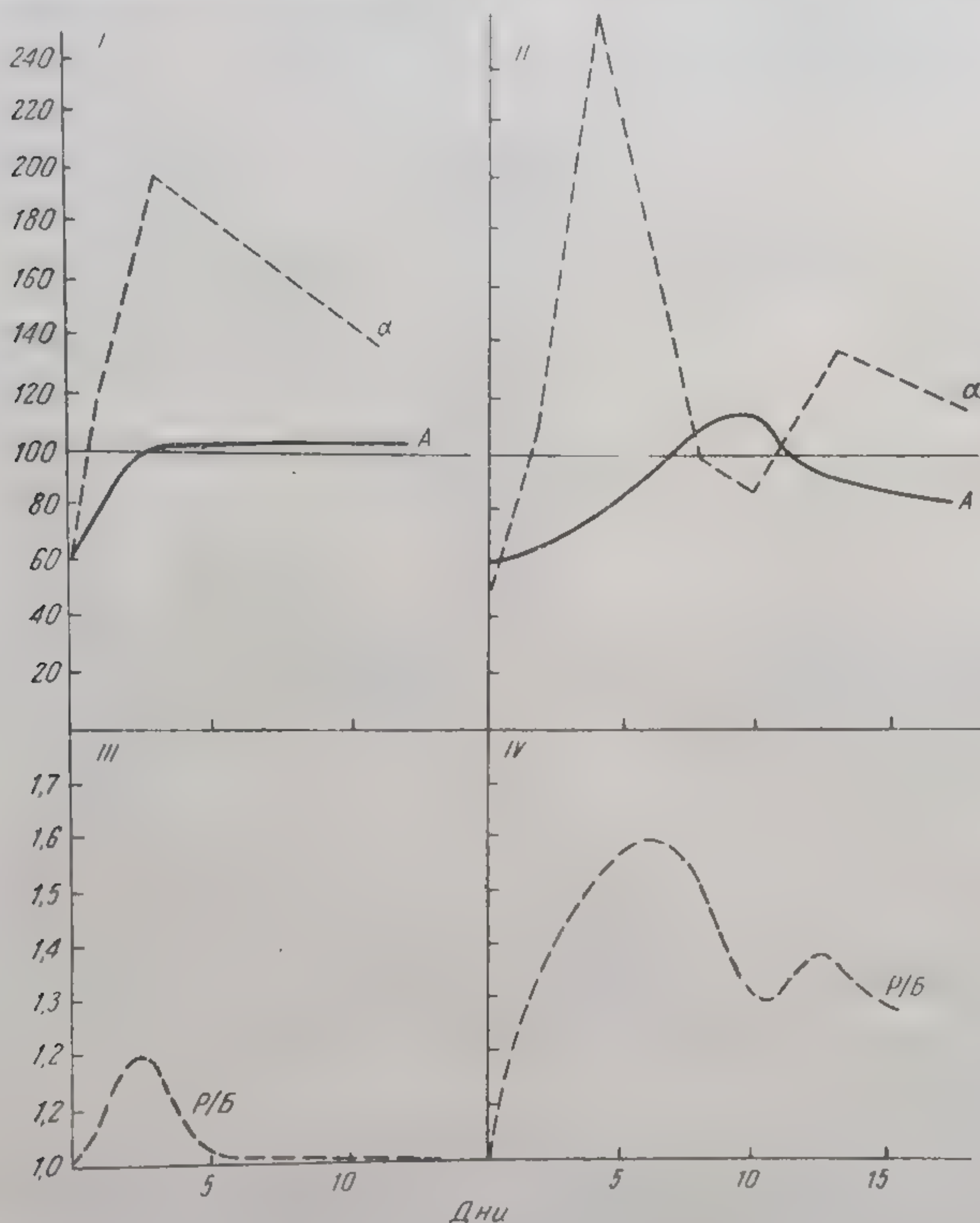


Рис. 5. Изменение концентрации белков после кровопускания. I и III — здоровые кролики; II и IV — с гиперхолестеринемией; ординаты — % к исходной концентрации, абсциссы — время после кровопускания в днях. A — концентрация альбумина, α — α -глобулина; P/B — отношение концентраций белка, определенных рефрактометрически и биуретовым методом.

чало содержание белков такими неспецифическими методами, как определение рефракции или по способности связывать краски. Нами использованы одновременно два метода: биуретовый и рефрактометрический. Известно, что биуретовым методом определяется концентрация только белка, а рефрактометрическим — сумма белка и небелковых компонент. На рис. 5 представлены кривые, выражающие отношение цифр, полученных при определении общей концентрации белков обоими методами. Кривые имеют максимум, нии общей концентрации белков обоими методами. Кривые имеют максимум, отражающий факт обогащения белка небелковой компонентой. При гипер-

холестеринемии максимум выражен намного больше, что свидетельствует о более быстрой регенерации липидной части по сравнению с белковой. Эти факты в известной мере объясняют большую скорость метаболизма липопротеидов, так как она, видимо, находится в связи с большей скоростью метаболизма липидной компоненты. Эти изменения могут быть объяснены с помощью простой теории, основанной на анализе транспортной роли белков [23]. Однако реальные отношения более сложны. Лабильность липопротеидов обнаруживается и в других случаях. Так, количество липопротеидов нарастает в крови при усиленной умственной работе, общем охлаждении тела [80]. На концентрацию липопротеидов влияет ряд гормонов [81]. Известны также значительные изменения в их содержании при различной патологии [13, 74, 76], особенно при атеросклерозе, заболеваниях почек и диабете. Большой интерес, проявляемый в настоящее время к липопротеидам, вызван в основном желанием более подробно разобраться в патогенезе атеросклероза. Следует отметить, что концентрация общих липопротеидов хорошо характеризует алиментарный атеросклероз, но что касается атеросклероза человека, то, по-видимому, прав Кейс и некоторые другие авторы [82, 83], считающие, что концентрация липопротеидов крови, так же как и концентрация холестерина, ценна только в качестве статистических показателей. Атеросклероз у человека может развиваться на фоне нормального содержания липопротеидов и холестерина. В связи с этим очень многие патологи и клиницисты подчеркивают разницу между

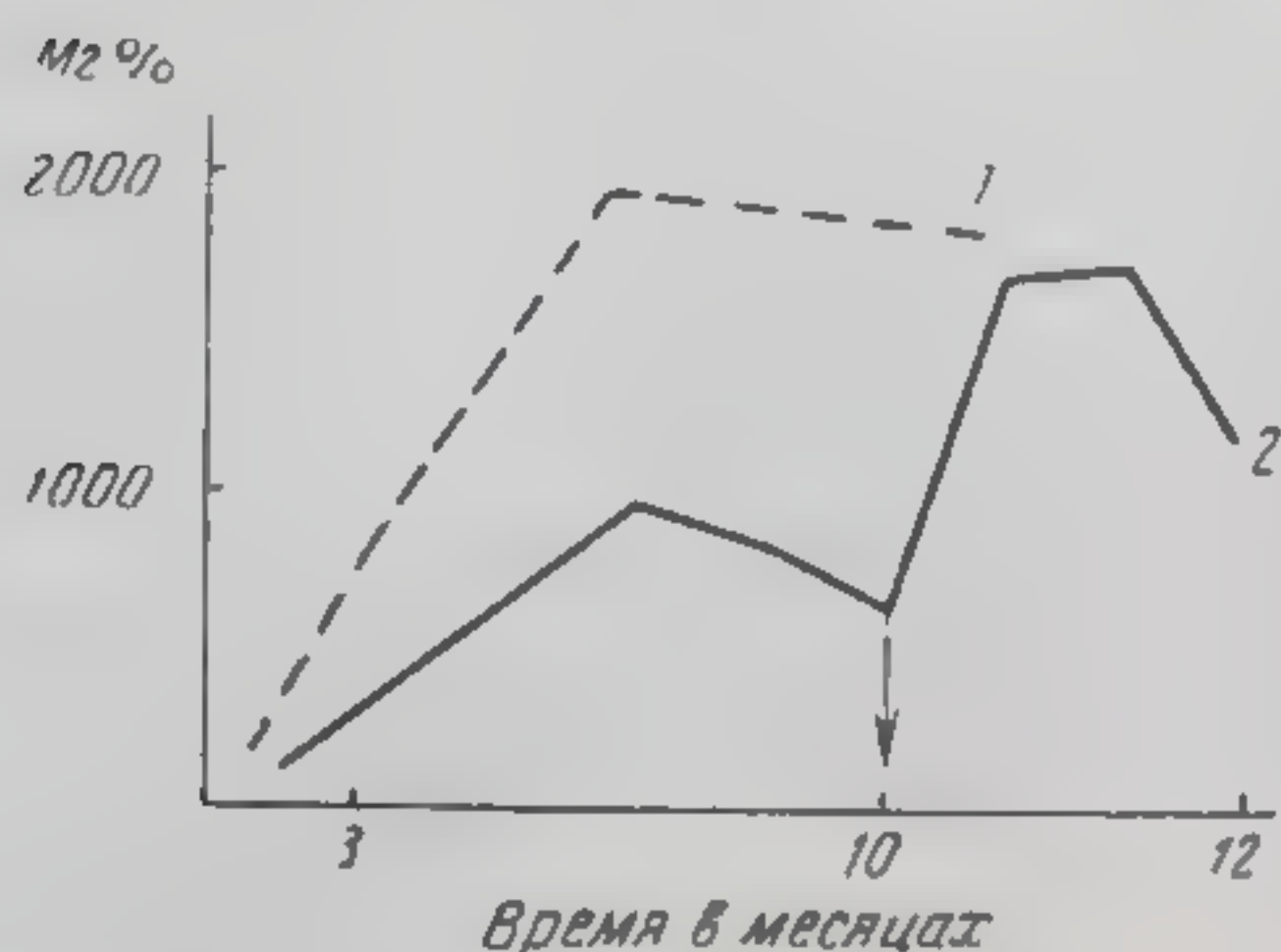


Рис. 6. Влияние витамина Е на холестеринемию у кроликов.

Ординаты — мг% холестерина в крови. 1 — кормление кроликов холестерином + витамином Е; 2 — то же до времени, обозначенного стрелкой, без витамина Е, после — с добавлением витамина Е.

атеросклерозом человека и алиментарным атеросклерозом кроликов. В последнем случае этиология не вызывает сомнений. Однако и при алиментарном атеросклерозе иногда можно наблюдать несоответствие между высотой гиперхолестеринемии и выраженностью атеросклероза. Так, например, показано [84], что дача кроликам препаратов витамина Е вместе с холестерином вызывает резкое увеличение гиперхолестеринемии (до 2000 мг% вместо обычных 500—700 мг%) и вместе с этим не приводит к увеличению атеросклероза (рис. 6).

Аналогичное наблюдение с веществами совсем другого рода сделано Форбсом и Петерсоном [85]. Введение гиперхолестеринемичным кроликам, поверхностно активного вещества резко усиливает гиперхолестеринемию и тормозит развитие атеросклероза.

С другой стороны, антиатеросклеротическое действие таких веществ, как цитраль и витамин К, обнаруживается на фоне хорошо выраженной гиперхолестеринемии [86, 87]. Возможно, что детальное изучение свойств белков в направлении выявления не только их способности увеличивать растворимость, но и влиять на коагуляцию липидов, позволит более определенно охарактеризовать значение липопротеидов в патогенезе атеросклероза. Следует, конечно, учитывать и возможность местных биохимических изменений в органе, поражаемом атеросклерозом [88].

ЛИТЕРАТУРА

1. Edsall J. T. Adv. prot. chem., 1947, 3, 384.
2. Macheboeuf M. Dis. Far. Soc., 1949, 6, 62.
3. Rubin L., Aladjem F. Am. J. Physiol., 1954, 178, 2, 269.

4. Fishberg A., Fridfield L., Hoffman J., Stoller E. R., Fichberg E. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, 75, 301.
5. Троицкий Г. В., Тарасова Л. С. *Биохимия*, 1955, 20, 19.
6. Bier M. *Electrophoresis*. N. Y. Acad. Press., 1959.
7. Grabar P. *Adv. Prot. Chem.*, 1958, 13, 1.
8. Rebeuyotte P. *Bull. Chim. Biol.*, 1954, 36, 1617.
9. Cagli V., Marchi M., Mariononi G., *Bol. Soc. ital. Bioll. sperim.*, 1956, 32, 573.
10. Baar S. *Nature*, 1958, 182, 4530.
11. Pezold F. A. *Clin. Chim. Acta.*, 1958, 3, 40.
12. Smities O. *Adv. Prot. Chem.*, 1959, 14, 65.
13. Троицкий Г. В. *Успехи биологической химии*, 1958, 3, 152.
14. Gofmann J., Lingren F. T., Elliot H., *J. Biol. Chem.*, 1949, 179, 97.
15. Del Gatto L., Lindgreen F., Nichols A., *Analit. Chem.*, 1959, 31, 1397.
16. Троицкий Г. В. *Успехи биологической химии*, 1954, 2, 141.
17. Lindgren F. F., Nichols A. V. in Putnam F. W. (Edit) «*The Plasma Proteins*», 2. 2—52 A. P. N. Y. Acad. Press., 1960.
18. Kunkel H., Trautman J. *Clin. Inv.*, 1956, 35, 641.
19. Hazelwood R. N. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 2152.
20. Scanu A., Lewis L., Bumps F. *Arch. Bioch. Bioph.*, 1958, 74, 390.
21. Shore B. *Arch. Bioch. Bioph.*, 1957, 71, 1.
22. Тристрам Г. *Белки*, М., 1956, т. I.
23. Троицкий Г. В., Окулов В. И., Сорокина Д. А. *Биохимия*, 1961, 26, 45.
24. Schrade W. *Klin. Wschr.*, 1954, 32, 227.
25. Oncley J. In *Chemistry of Lipides as related to Atheros.*, 1958, Ac. oress. p. 114—129.
26. Avigan J., Radfield R., Steinberg D. *Bioch. Biophys. Acta*, 1956, 20, 557.
27. Oncley J., Walton K., Cornwell D. J. *Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 4666.
28. Burstein M., Somaile J. J. *Physiol.*, 1957, 49, 83.
29. Burstein M. C. r. *Acad. Sci.*, 1957, 245, 588.
30. Bernfield P. *Simp. Res. Adv. Appl. Med. Pract.*, 1958, 3, 24.
31. Bernfield P., Berkowitz M., Donahue V. M. *J Clin. Invest.*, 1958, 36, 1363.
32. Scanu A., Lewis L., Page I. J. *Lab. Clin. Med.*, 1958, 51, 325.
33. Oncley J. *Chemistry Lipodes as related to Atheroic.*, Ac. oress., 1958, p. 114—129.
34. Philips G. B. *J. Clin. Invest.*, 1959, 38, 489.
35. Nelson C., Freeman N. J. *Biol. Chem.*, 1960, 235, 578.
36. Dervichian D. *Diss. Far. Soc.*, 1949, 6, 7.
37. Booi I. *Diss. Far. Soc.*, 1949, 6.
38. Мургау Лук J. *Diss. Far. Soc.*, 1949, 6.
39. Окунев Н. В., Благоразумова М. А. *Биохимия*, 1949, 14, 308.
40. Oncley J. In Tullis J. *Blood. Cells....*, N. Y. Acad. Press., 1953.
41. McFarlane A. S. *Diss. Far. Soc.*, 1949, 6.
42. Bungenberg de Jong H., Weijzen W. *Proc. Koninkl Nederl. Acad. wetench.*, 1954, 57, 258.
43. Blix G., Tiselius A., Svensson H. J. *Biol. Chem.*, 1941, 137, 485.
44. McFarlane A. S. *Nature*, 1942, 149, 439.
45. Троицкий Г. В. *Биохимия*, 1950, 15, 426.
46. Кобозев Г. В. *Аппарат для микроэлектрофореза и изучение адсорбционных свойств белков плазмы*. Дисс. Симферополь, 1959.
47. Avigan J. J. *Biol. Chem.*, 1957, 226, 957.
48. Avigan J. J. *Biol. Chem.*, 1956, 20, 557.
49. Nikkila E. A. *Bioch. Biophys. Acta*, 1958, 27, 612.
50. Korn E. J. *Biol. Chem.*, 1957, 226, 827.
51. Korn E. J. *Biol. Chem.*, 1957, 226, 833.
52. Rodbell M., Fredrickson S. D. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 567.
53. Rodbell M. *Science*, 1958, 127, 701.
54. Avigan J., Eder H., Steinberg D. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, 91, 429.
55. Avigan J. J. *Biol. Chem.*, 1959, 234, 787.
56. Uonury J. *Physiol. Japan*, 1957, 19, 67.
57. Деборин Г. А., Горбачева Л. В. *ДАН СССР*, 1954, 95, 317.
58. Flory P. *Science*, 1956, 124, 53.
59. Flory P. J. *Cell Comp. Physiol.*, 49, suppl. 1, 1957.
60. Троицкий Г. В., Окулов В. И. *Биохимия*, 1958, 23, 4.
61. Jen Tsi Yang, Doti P. J. *Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 761.

62. Jirgensons B. Arch. Bioch. Bioph., 1958, 78, 227.
63. Linderstrom-Lang K., Schelman J. Bioch. Bioph. Acta., 1956, 15, 156.
64. Тарасова Л. С. Биохимия в печати.
65. Недзвецкий С. В. Биохимия, 1947, 12, 314.
66. Недзвецкий С. В., Ратницкая С. С. Биохимия, 1954, 19, 677.
67. Троицкий Г. В., Кобозев Г. В. Труды Крымского медицинского института, 1961, 31, 400.
68. Кобозев Г. В., Троицкий Г. В. Труды Крымского медицинского института, 1961, 31, 99.
69. Michel F., Dinklon E. Z. Physiol. Chem., 1953, 293, 5.
70. Epstein F., Block W. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1959, 101, 740.
71. Grundy S. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1959, 100, 704.
72. Ensleme J., Cottet J., Clero. Arch., malad at vaisseaux Rev. Atherosc., 1959, 1, 40.
73. Daughaday W. Physiol Rev., 1959, 39, 885.
74. Аничков Н. Н., Волкова К. Т. В кн.: Атеросклероз. Куйбышев, 1960.
75. Мясников. Атеросклероз. М., 1961.
76. Окунев Н. В. В кн.: Атеросклероз. Куйбышев, 1960.
77. Благоразумова М. А. Сб. научных работ Волгоградского медицинского института, 1959, 12, 27.
78. Miettinen M. Ann. Med. exp. Biol. fenniae, 1957, 35, 155.
79. Родионов В. М., Успенская В. Д., Замяткина О. Г. Вопросы медицинской химии, 1957, 3, 255.
80. Grundi S., Griffin A. J. Am. Med. As., 1959, 171, 1794.
81. Sternberg J. Canad. Med. Ass., 1959, 81, 665.
82. Keys A. J. Mt. Sinai Hosp., 1953, 20, 118.
83. Nestel P., Osborn E. Med. J. Australis, 1958, 2, 120.
84. Тарасова Л. С., Троицкий Г. В. Вопросы медицинской химии, 1960, 4, 62.
85. Forbes J., Petterson O. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1958, 99, 368.
86. Троицкий Г. В., Тарасова Л. С. Вопросы медицинской химии, 1956, 2, 428.
87. Троицкий Г. В. Сб.: Витамины. Киев, 1959.
88. Бавина М. В. Вестник Академии медицинских наук СССР, 1960.
89. Anfinsen Ch., Redfield R. Adv. Prot. Chem., 1956, 11, 2.

2. ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ И СВОЙСТВ. НЕКОТОРЫХ ГЛИКОПРОТЕИДОВ КРОВИ

Е. Л. Розенфельд

Среди разнообразных протеидов крови имеется большая группа соединений, составными частями которых являются углеводы и пептиды. Характерной особенностью этих веществ, называемых гликопротеидами, или мукопротеидами, является исключительное постоянство их содержания в крови, весьма мало меняющееся в зависимости от пола, возраста и физиологического состояния организма, и резкие сдвиги в их качественном и количественном составе при различных заболеваниях.

Это свойство гликопротеидов отражать течение самых разнообразных нарушений в организме привлекает внимание многочисленных исследователей — биохимиков и клиницистов. В настоящее время имеется большое количество данных об увеличении содержания гликопротеидов и отдельных углеводных компонентов гликопротеидов в крови при туберкулезе, злокачественных новообразованиях, воспалениях, инфекционных заболеваниях, а также об уменьшении их содержания при дисфункциях печени (циррозах,

инфекционном гепатите), при эндокринных дисфункциях (например, при гипертиреозидизме или при поражениях надпочечников) и многих других заболеваниях [1, 2].

Вопрос о заболеваниях, сопровождающихся изменениями в содержании гликопротеидов крови, и о значении этих изменений для клинической диагностики мог бы служить предметом специального обзора.

Даже различные формы или степень тяжести одного и того же заболевания по-разному сказываются на содержании в крови гликопротеидов, что особенно отчетливо выявляется при злокачественных новообразованиях и туберкулезе легких. Не только в крови, но и в спинномозговой жидкости и других жидкостях и тканях содержание связанных с белками углеводов резко меняется при многих заболеваниях и учет этих изменений имеет важное диагностическое и прогностическое значение.

Так, например, содержание гликопротеидов (мукопротеидов) в спинномозговой жидкости увеличивается в 3—4 раза при менингитах и энцефалитах. Высокий уровень гликопротеидов в спинномозговой жидкости свидетельствует также о возможном наличии опухоли в центральной нервной системе [3]. По составу гликопротеиды спинномозговой жидкости очень близки к гликопротеидам крови, хотя некоторые различия между ними имеются [4].

Исследование гликопротеидов плевральной и асцитических жидкостей показало, что по составу углеводных компонентов они также в основном напоминают гликопротеиды плазмы крови [5], однако содержание в них гексозаминов несколько ниже, а сиаловых кислот выше, чем в крови [6]. При злокачественных новообразованиях наблюдается значительное повышение содержания гексозамина в гликопротеидах крови. Отсутствие подобного повышения является одним из признаков того, что происхождение жидкости не связано с наличием опухоли.

К сожалению, получаемые результаты об изменениях содержания гликопротеидов и их углеводных компонентов в крови и других жидкостях и тканях могут в настоящее время лишь информировать о ходе нарушений, но не могут пока объяснить механизм происходящих изменений. Это обстоятельство связано, по-видимому, с тем, что состав, строение, функции и особенности обмена большинства гликопротеидов до сих пор еще в достаточной степени не изучены и даже вопрос о классификации этих веществ является предметом споров и разногласий, хотя ему и уделяется много внимания в экспериментальных работах, а также в ряде обзоров [7, 8, 9].

В крови имеются протеиды, содержащие сравнительно мало углеводов (меньше 10%), протеиды, содержащие значительное количество углеводов (от 10 до 40%) и так называемые мукоиды—вещества, содержащие полипептиды и значительное количество (от 40 до 75%) углеводов (например, специфические вещества групп крови). Кроме того, в крови имеются не содержащие аминокислот мукополисахариды (гепарин, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты), в состав которых входят уроновые кислоты и аminosахара и их производные. В зависимости от того или иного содержания в протеидах аminosахаров предложено разделить их на мукоиды и гликоиды [10]. Однако такое деление малорационально: хотя аminosахара входят в состав всех протеидов, содержащих углеводные компоненты, количество их примерно одинаково в различных по функциям и строению веществах (например, в фибриногене и γ -глобулине) и, напротив, различно в очень сходных (например, в различных фракциях серомукоида).

В зависимости от характера связей между углеводными и белковыми компонентами протеидов было предложено делить их на гликопротеиды и мукопротеиды. Это деление крайне условно, так как, во-первых, не всегда возможно определить природу связей между отдельными звеньями молекул

протендов, и во-вторых, в одном и том же соединении могут встречаться различные типы связей между его компонентами.

Некоторые авторы считают термин «мукопротеиды» более общим, а термин «гликопротеиды» более частным; другие придерживаются обратного мнения. Оба термина часто применяют для обозначения одних и тех же веществ. Иногда смешивают понятие «мукопротеиды» и «мукополисахариды», а между тем последние не являются протеидами, хотя образуют более или менее прочные комплексы с белками. Некоторые специалисты предлагают называть все полисахариды, содержащие аминсахара, не мукополисахаридами, а аминопалисахаридами [8, 11], а протеиды, содержащие углеводные компоненты, — гликопротеидами, а не мукопротеидами, независимо от соотношения в их молекулах углеводных и белковых компонентов, так как эти термины основаны на химических, а не физиологических признаках, что, как нам кажется, весьма рационально.

Анализируя работы о составе и свойствах гликопротеидов крови, следует учитывать, что сопоставление данных, получаемых различными авторами с помощью различных методов, не всегда возможно, так как многие из применяемых методов недостаточно специфичны.

Часто присутствие одних сахаров мешает определению других. Так, определению глюкуроновой кислоты может мешать присутствие галактозы и маннозы [12], определению нейраминной кислоты — присутствие фруктозы [13]. Особенно осторожно следует относиться к более ранним работам в этой области. В настоящее время для удаления примесей, мешающих той или иной реакции, многие авторы применяют соответствующие смолы и адсорбенты, что значительно повышает надежность получаемых результатов.

Получение гомогенных препаратов гликопротеидов связано обычно с большими трудностями. Помимо аналитических данных и данных об оптической активности, константах седиментации и электрофоретической

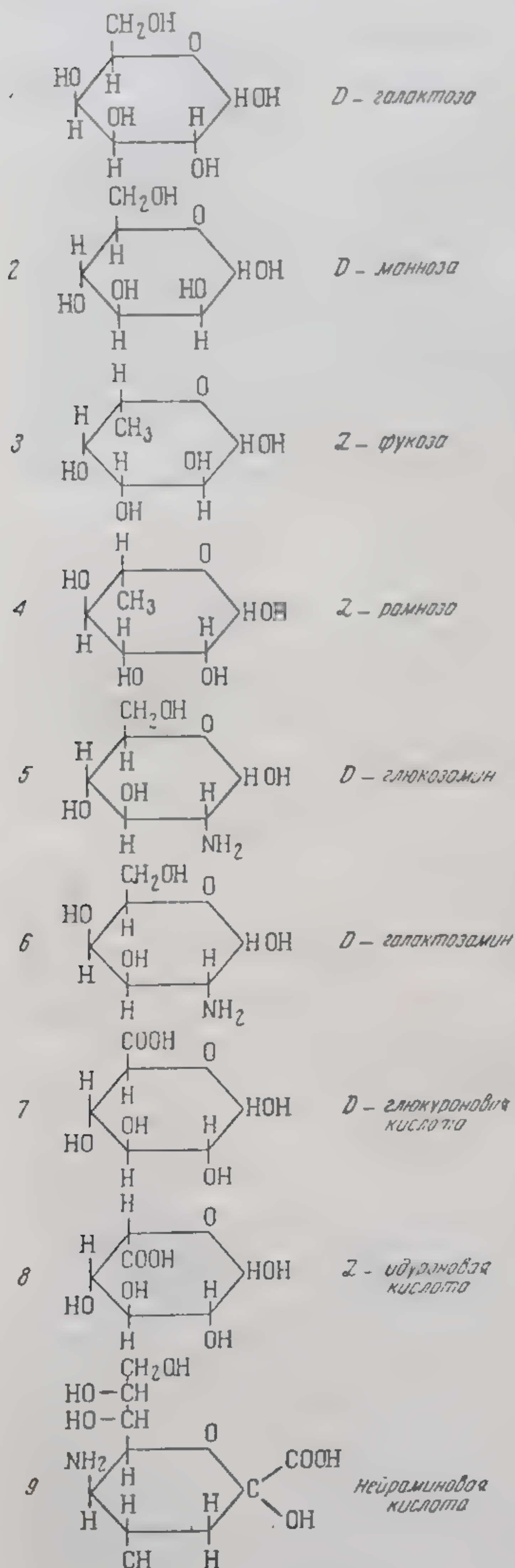


Рис. 1. Углеводные компоненты гликопротеидов.

подвижности, чрезвычайно важными для оценки гомогенности препаратов являются данные, получаемые с помощью специфических ферментов и иммунохимических реакций [14, 15, 16, 17]. Углеводные компоненты гликопротеидов хорошо известны, они состоят из гексоз и их производных (рис. 1).

Из гексоз в гликопротеидах встречаются главным образом галактоза и манноза, причем определенное соотношение между количеством обеих гексоз (1:1; 1:2; 2:1 и т. д.) характерно для различных протеидов. Глюкоза в молекулах гликопротеидов либо отсутствует, либо содержится в незначительных количествах. Так, например, в очищенном препарате гаптоглобина обнаружено около 0,5% глюкозы, что составляет $\frac{1}{20}$ общего содержания в нем гексоз [18].

Из 6-дезоксигексоз в гликопротеидах большое распространение имеет L-фукоза (6-дезоксигалактоза). L-Манноза (6-дезоксиманноза) в гликопротеидах встречается редко. Недавно она была обнаружена в очищенном препарате гонадотропина, выделенном из сыворотки жеребой кобылы [19].

В составе гликопротеидов всегда имеется значительное количество глюкозамина (2-амино-2-дезоксиглюкозы) и часто значительно меньшее количество галактозамина (2-амино-2-дезоксигалактозы). Маннозамин (2-амино-2-дезоксиманноза) входит в состав нейраминной кислоты — продукта альдольной конденсации ацетилманнозамина и пировиноградной кислоты. Гексозамины обычно находятся в гликопротеидах в виде ацильных производных. Чаще всего в гликопротеидах встречаются ацетилнейраминная и гликолилнейраминная кислоты, называемые сиаловыми кислотами [20].

В состав гликопротеидов сыворотки входит главным образом ацетилнейраминная кислота, а в состав гликопротеидов стромы эритроцитов — гликолилнейраминная кислота [21]. Маннозамин в организме животных был обнаружен лишь как составная часть нейраминной кислоты, однако, весьма вероятно, что он имеется и в других соединениях, но не был до сих пор обнаружен вследствие трудности его идентификации и отделения от других гексозаминов [22].

Уроновые кислоты содержатся в гликопротеидах в небольших количествах. При некоторых заболеваниях, например при ревматизме, лейкемии [23], содержание их увеличивается. Относительно велико содержание уроновых кислот в лейкоцитах и тромбоцитах. Кроме D-глюкуроновой кислоты, в состав некоторых аминополисахаридов входит L-идуроновая кислота. В табл. 1 приводятся данные о содержании важнейших углеводов, связанных с белками в сыворотке человека [24].

Таблица 1
Углеводы, связанные с белком в сыворотке людей
различного возраста (в мг на 100 мл)

Возраст в годах	Белок г/100	Гексозы	Гексозамины	Сиаловые кислоты	Всего угле- водов	Фукоза	Серомукоид
26—35	7,29	110,2	95,1	65,1	270,4	8,3	86,9
36—45	7,14	109,1	94,0	66,3	269,3	7,7	83,1
46—55	7,24	113,4	98,8	68,7	281,0	9,0	84,1
56—65	7,10	112,1	94,1	68,2	271,4	8,6	89,9
66—75	7,26	115,8	100,2	71,8	287,8	8,7	85,9
26—72	7,22	111,3	95,8	66,9	274,0	8,4	86,0

Как видно из приведенных данных, содержание гексоз и гексозаминов, связанных с белками сыворотки, почти не меняется у людей различного возраста. Незначительное увеличение в содержании нейраминовой кислоты наблюдается у людей более старшего возраста. Подобное увеличение содержания нейраминовой кислоты в сыворотке, зависящее от возраста, наблюдали и другие авторы [25]. Содержание гексоз увеличивается при туберкулезе легких в среднем до 165 мг/100 мл [26]. При инфильтративных процессах увеличение достигает в среднем 183 мг/100 мл; в случае продуктивного процесса оно снижается до 145 мг/100 мл. По данным других авторов, содержание гексоз, связанных с белком, при туберкулезе достигает более высоких величин (200—300 мг/100 мл) [27].

Наблюдается связь между содержанием в крови гексоз, связанных с белком, и РОЭ (реакцией оседания эритроцитов) больных туберкулезом легких (табл. 2).

Таблица 2
Влияние РОЭ на содержание гексоз в крови больных туберкулезом легких

Величина РОЭ	< 10 мм	10—20 мм	20—40 мм	> 40 мм
Содержание гексоз	151	166	186	188

Между изменением скорости РОЭ и содержанием в крови нейраминовой кислоты наблюдается прямая связь [28]. Причина этого явления не выяснена.

Имеется много исследований, посвященных вопросу о содержании углеводов, связанных с белками, в отдельных электрофоретических фракциях сыворотки крови. Наибольшее количество углеводов обнаруживается во фракциях α_1 - и α_2 -глобулинов, а наименьшее — в альбуминовой фракции.

В табл. 3 приведены данные о содержании отдельных углеводных компонентов в электрофоретических фракциях крови человека, полученных с помощью электрофореза на хлористом поливиниле [30].

Таблица 3
Углеводные компоненты электрофоретических фракций крови человека в мг/100 мл

Фракции	Белок	Гексозы	Гексозамины	Сиаловые кислоты	Всего углеводов	Всего углеводов в % к белку
Альбумин	4 000	2	6	4	12	0,3
Глобулины:						
α_1	260	22	16	16	54	20,8
α_2	580	36	27	27	90	15,5
β	470	20	16	20	56	11,9
γ	1 020	35	19	8	62	6,1
Всего	6 330	115	84	75	274	4,3

Определение гликопротеидов в отдельных электрофоретических фракциях сыворотки часто имеет большее диагностическое значение, чем их суммарное определение. Особенно характерны изменения, наступающие при

некоторых заболеваниях в соотношении между углеводными компонентами фракций α_1 и α_2 . В качестве примера на рис. 2 приведены данные о содержании углеводов в электрофоретических фракциях сыворотки здоровых и больных раком легкого [29].

Часто значительно важнее знать не содержание гликопротеидов и их компонентов в отдельных электрофоретических фракциях, а содержание индивидуальных углеводов в индивидуальных гликопротеидах. Иногда содержание в крови гексоз и их производных в норме и при некоторых заболеваниях одинаково [31, 32], однако это не всегда отражает происходящие

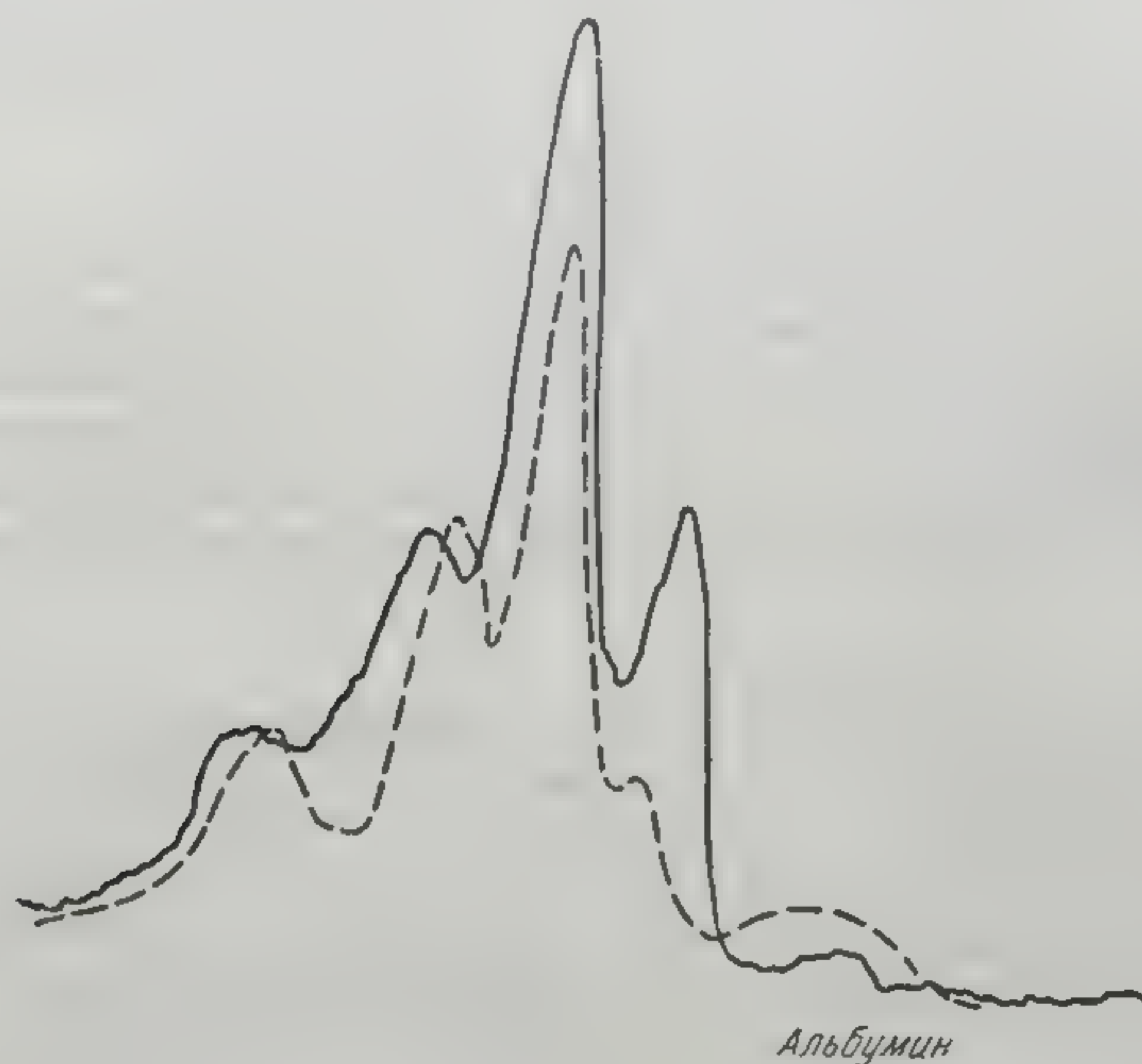


Рис. 2. Глюцидограмма крови.
— — — норма; — рак легкого.

в действительности изменения, так как уменьшение количества того или иного компонента в одних гликопротеидах может сопровождаться соответствующим увеличением количества тех же веществ в других. Примером могут служить данные Дейса и Холмса [33] о содержании гексозаминов в крови здоровых и больных.

Так, содержание гексозаминов сыворотки колеблется при коллагенозах в тех же пределах, что и в норме. Между тем в α_1 -гликопротеидах гексозаминов при этих заболеваниях почти на 80% больше, чем в норме. Описано несоответствие в изменениях содержания фукозы в сыворотке и в отдельных белковых фракциях при некоторых заболеваниях [34, 35]. То же отмечается в отношении сиаловых кислот [28].

Данное обстоятельство необходимо особо учитывать при исследовании таких веществ, как фукоза и нейраминная кислота. Эти вещества, имеющие сравнительно короткую историю изучения, являются чрезвычайно важными и в то же время лабильными компонентами, резко меняющими физико-химические и биологические свойства протеидов. Весьма вероятно, что именно они в значительной степени ответственны за нарушения в обмене различных гликопротеидов, наблюдаемые при некоторых заболеваниях.

В настоящее время из крови выделено несколько десятков индивидуальных гликопротеидов, чрезвычайно разнообразных по своим биологическим функциям. Среди них имеются гормоны (гонадотропин, эритропоэтин, гормон, стимулирующий образование фолликул), ферменты (церулоплазмин — лакказа, холинэстераза), а также ингибиторы и активаторы ферментов и «переносчики» гормонов.

К гликопротеидам относится ряд веществ, связанных с системой свертывания крови (фибриноген, протромбин), вещество, обладающее коронаросуживающим действием [36]. Гликопротеидами являются вещества, ответственные за серологическую специфичность (γ -глобулины, компоненты комплемента, специфические вещества групп крови). В то время как одни гликопротеиды получены в высокоочищенном виде и строение их более или менее детально исследовано, другие до сих пор не выделены в достаточно очищенном виде, а потому еще мало изучены.

В табл. 4 приводятся данные о составе углеводных компонентов некоторых гликопротеидов крови. Как видно из данных таблицы, различные гликопротеиды в значительной степени отличаются между собой по составу углеводных компонентов. В орозомукоиде, церулоплазмине, протромбине и трансферрине галактозы вдвое больше, чем маннозы. В гаптоглобине и макроглобулине обе гексозы содержатся в одинаковом количестве. В γ -глобулине и фибриногене, напротив, маннозы вдвое больше, чем галактозы.

Т а б л и ц а 4
Состав углеводных компонентов некоторых гликопротеидов крови [9] (содержание углеводов в молях на моль гликопротеида)

	Галактоза	Манноза	Гексозамины	Сиаловые кислоты	Фукоза
Орозомукоид	24	12	26	16	2—4
Церулоплазмин	16	8	16	10	1,5
Гаптоглобин	27	27	27	13	1
α_2 -макроглобулин	85	85	110	50	7
Протромбин	10	5	8	8,5	0,5
Трансферрин	8	4	8	4	0,5
Фибриноген	7	14	14	7	0
γ -глобулин	3	6	9	1,5	2
Фетуин	12	4	11	10	0

Фибриноген, а также фетуин [37] не содержат фукозы. В специфических веществах групп крови, по-видимому, нет маннозы. В приведенной таблице отсутствуют данные о содержании в гликопротеидах уроновых кислот, которые обнаружены в фибриногене, α_2 -макроглобулине и орозомукоиде [12]. В металлопротеидах — трансферрине и церулоплазмине — уроновых кислот, по-видимому, нет. Все без исключения гликопротеиды, так же как и аминополисахариды, содержат гексозамины. Существует мнение, что гексозамины являются связующими звеньями между пептидными и углеводными цепями в молекулах гликопротеидов [10]. При гидролизе гликопротеидов они обычно отщепляются позднее, чем другие сахара.

Сиаловые кислоты обнаружены во всех гликопротеидах. Относительно меньше сиаловых кислот в γ -глобулинах. Фукоза, напротив, в γ -глобулинах содержится в большем количестве, чем в других гликопротеидах.

При фракционировании высокоочищенных препаратов γ -глобулинов с помощью электрофореза получены фракции, содержащие различное ко-

личество нейраминной кислоты и фукозы. Более высокому содержанию нейраминной кислоты соответствовало более низкое содержание фукозы и наоборот [38].

Т а б л и ц а 5
Содержание нейраминной кислоты
и фукозы в некоторых фракциях
γ-глобулинов (в % к белку)

Фракции	I	VII	VIII
Нейраминная кислота	0,27	0,51	0,79
Фукоза	0,18	0,16	0,14

Хотя качественный и количественный состав углеводов в молекулах важнейших гликопротеидов в настоящее время в основном выяснен, этих данных недостаточно для решения вопроса об особенностях их строения и о связи между их строением и биологической активностью.

Относительно чередования гексоз и их производных в молекулах гликопротеидов и о типах связей между ними известно очень мало. Больше всего экспериментальных данных в этой области имеется относительно строения углеводных компонентов орозомукоида. Жанло [39] приводит ряд схем, в которых показана возможность чередования различных углеводных остатков в молекулах орозомукоида (рис. 3).

Как видно из приведенных схем, в молекулах орозомукоида конечное положение занимает всегда нейраминная кислота. Это легко доказывается при действии на орозомукоид разбавленных кислот или соответствующих ферментов (нейрамидаз).

В первом случае нейраминная кислота отщепляется раньше других углеводов, во втором — она является единственным низкомолекулярным продуктом реакции. С нейраминной кислотой в молекулах орозомукоида связана галактоза.

Методом метилирования установлено, что с редуцирующей группой у второго углеродного атома нейраминной кислоты связан гидроксил третьего углеродного атома галактозы. В приведенных схемах не нашло отражения положение фукозы в молекулах орозомукоида, хотя она является постоянным компонентом этого протеида (табл. 4). Конечное положение в молекулах многих других гликопротеидов также занимает нейраминная кислота, например в молекулах гормонов (гонадотропина) [40, 41], эритро-

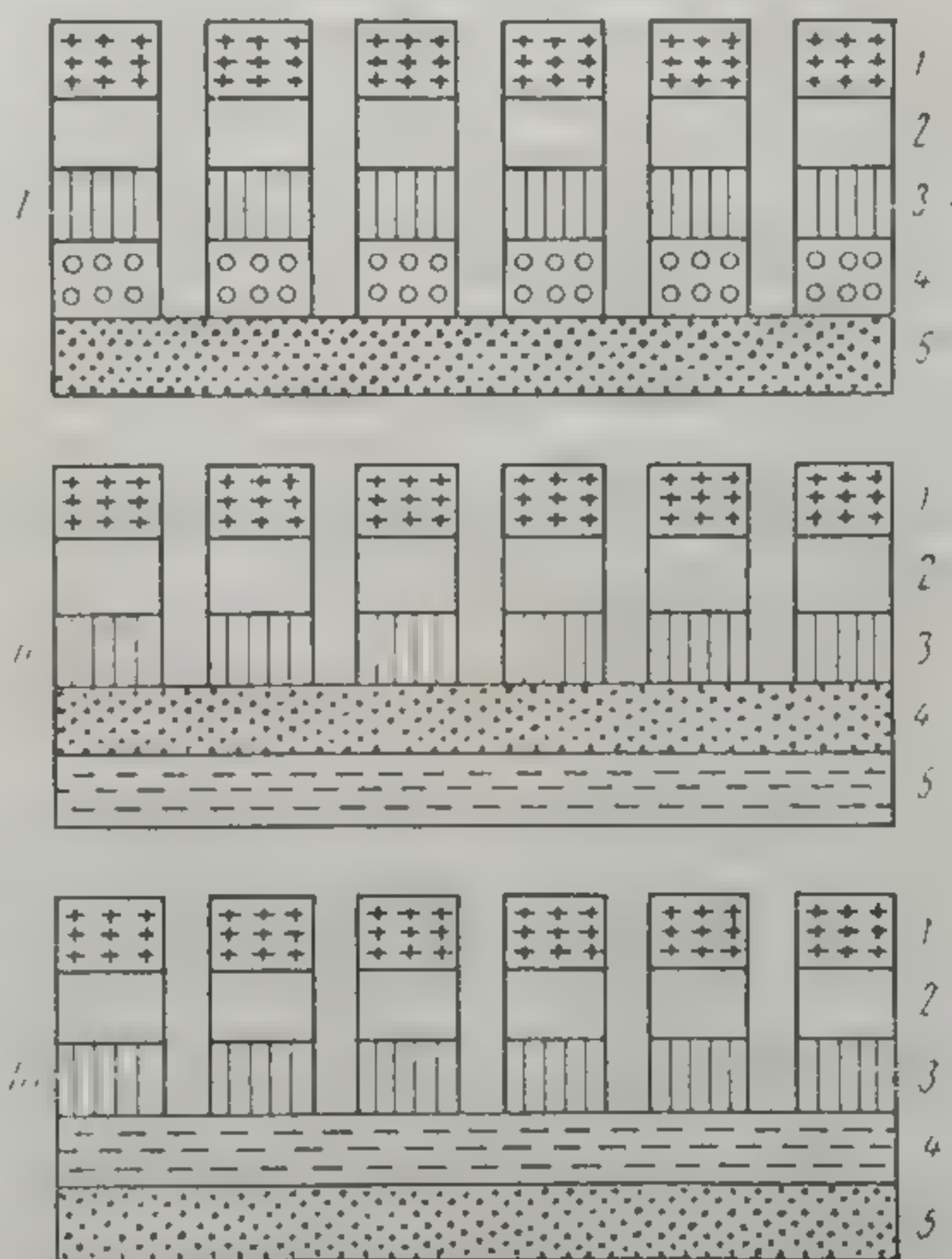


Рис. 3. Схема строения орозомукоида.
I. 1 — нейраминная кислота; 2 — галактоза; 3 — глюкозамин; 4 — манноза; 5 — белок.
II. 1 — нейраминная кислота; 2 — галактоза; 3 — глюкозамин; 4 — белок; 5 — глюкозамин-манноза.
III. 1 — нейраминная кислота; 2 — галактоза; 3 — глюкозамин; 4 — глюкозамин-манноза; 5 — белок.

поэтина [42, 43] и гормона, стимулирующего образование фолликул [43a]. Однако с помощью гидролиза разбавленными кислотами было показано, что в молекулах некоторых гликопротеидов конечное положение занимает фукоза [44]. Как и нейраминная кислота, она является лабильным звеном, играющим какую-то важную роль в обменных реакциях гликопротеидов [45, 46], хотя количество ее в молекулах невелико.

Наибольшее количество фукозы характерно для гликопротеидов и аминосугаров, связанных с защитной функцией организма (специфические вещества групп крови, γ -глобулины). При некоторых заболеваниях содержание фукозы в γ -глобулинах меняется (например, при заболеваниях ретикуло-эндотелиальной системы) [34, 46]. При кислотном гидролизе гликопротеидов крови здоровых и больных были обнаружены различия в скорости ее отщепления, что может быть следствием изменений у последних типов связи между фукозой и смежными с ней остатками сахаров, так как различные типы гликозидных связей гидролизуются с различной скоростью.

Относительное содержание в орозомукоиде фукозы и нейраминной кислоты приводит к предположению, что на одну пептидную цепь в его молекулах приходится по крайней мере 16 олигосахаридных цепей, конечным звеном которых является нейраминная кислота и 2—4 цепи с фукозой в качестве конечного звена. Возможно, что цепи ветвисты.

Структура γ -глобулинов изучалась Розевер и Смитом [47], которые расщепляли γ -глобулины сыворотки крови папаином и получили ряд очень сходных по молекулярному весу гликопептидов. На один моль тирозина в гликопептидах приходится 9 остатков гексоз, 6 остатков глюкозамина, 2 остатка фукозы и один — нейраминной кислоты, что соответствует соотношению между этими сахарами в молекулах исходных γ -глобулинов. Авторы считают, что углеводные компоненты занимают конечное положение в молекулах и связаны в гликопептидах с аспарагиновой кислотой. По-видимому, связь между углеводными и пептидными компонентами других гликопротеидов также может осуществляться через аспарагиновую кислоту [48, 49].

Михель и Клокер [50] гидролизировали γ -глобулины, полученные из сыворотки различных животных (коров, свиней, уток), и выделяли гликопептиды с высоким содержанием углеводов. Различия в содержании гексоз, гексозаминов и фукозы в составе γ -глобулинов, выделенных из крови здоровых и больных животных (пневмония, абсцессы легких), были незначительны, но содержание нейраминной кислоты в крови больных животных снижалось. Наблюдались различия в составе углеводных компонентов γ -глобулинов различных видов животных.

Мы исследовали углеводные компоненты γ -глобулинов человека, лошади и кролика.

Наибольшее количество фукозы обнаружено в γ -глобулинах лошади, а наименьшее — в γ -глобулинах кролика. Однако количество «конечной» фукозы было наиболее высоким в γ -глобулинах кролика.

Количество гексоз и нейраминной кислоты было наибольшим в γ -глобулинах человека [50a].

Процессы образования и обмена гликопротеидов крови сравнительно мало изучены [51]. Многочисленные экспериментальные данные и наблюдения клиницистов свидетельствуют о несомненной роли печени в их синтезе. У кроликов с пораженной (фосфором или бензолом) печенью после кровопускания не восстанавливается содержание гликопротеидов крови, что имеет место в опытах со здоровыми животными. При паренхиматозных поражениях печени концентрация серомукоида в крови больных понижена. При внутривенном введении Cu^{64} меченый церулоплазмин обнаружи-

В настоящее время хорошо изучен процесс энзиматического ацетилирования гексозаминов с помощью ферментных механизмов животных тканей, а также превращение ацетилглюкозамина в ацетилгалактозамин и в ацетилманнозамин. На рис. 4 приведена одна из возможных схем превращения гексозаминов и их производных, а также уроновых кислот и их производных в животном организме.

В биосинтезе аминополисахаридов и их компонентов важную роль, по видимому, играет витамин А. Вольф и Варандани [58] показали, что у крыс с А-витаминной недостаточностью внедрение S^{35} -сульфата и C^{14} -глюкозы в аминополисахариды вдвое ниже, чем у контрольных животных.

По данным Моретти и Вольф [59], у крыс с авитаминозом А содержание гексозамина в аминополисахаридах значительно ниже, чем его содержание у контрольных животных. Прибавление витамина А к гомогенатам, полученным из тканей животных с А-витаминной недостаточностью, восстанавливает процессы синтеза гексозамина в этих гомогенатах [59a].

Мейер и Гофман [60] установили зависимость между синтезом мукополисахаридов и содержанием витамина С. При скорбуте способность к синтезу хондроитинсульфата в печени снижается.

Биосинтез фукозы в организме изучали с помощью меченой в первом положении фукозы (C_1^{14} фукозы); при внутривенном ее введении происходит быстрое образование $C^{14}O_2$ (более быстрое, чем при введении D- C_1^{14} глюкозы [16]). Энзиматическое отщепление фукозы ферментными препаратами животных тканей описано Леви [62]. Оптимум действия фукозидазы при pH 6. Особенно высока ее активность в эпидидимисе крыс (во много раз выше, чем в печени) [62a].

Ферменты, расщепляющие нейраминную кислоту на ацетилгексозамин и пировиноградную кислоту и синтезирующие ее из этих компонентов (альдолаза нейраминной кислоты), а также фермент, отщепляющий ее от молекул гликопротеидов (нейраминидаза), хорошо изучены у бактерий и вирусов [63, 64]. В животном организме они до настоящего времени не были известны. Варрен и Спринг [65] показали, что некоторые гликопротеиды содержат нейраминидазу, а Комб и Роземан [22] упоминают о наличии в мозгу и печени крыс активности, подобной активности бактериальной альдолазы нейраминной кислоты. Нами было показано [22a], что в семейных железах крыс имеется активный фермент, расщепляющий нейраминную кислоту. Оптимум его действия лежит при pH 7,4.

Обмен хондроитинсульфатов изучался путем введения $Na_2S^{35}O_4$ per os или внутрибрюшинно взрослым крысам. В животных тканях доказан синтез этих аминополисахаридов. Из кожи кроликов была выделена сульфотрансфераза. Этот фермент обладает большей субстратной специфичностью по отношению к хондроитину В, чем к хондроитину А и С, а также к кератосульфату и гиалуроновой кислоте [66].

Источником свободных аминополисахаридов крови являются главным образом лейкоциты и тромбоциты.

В тромбоцитах обнаружен хондроитинсульфат В или β -гепарин [21]. В отличие от хондроитинсульфата А (или хондроитин-4-сульфата) и хондроитинсульфата С (или хондроитин-6-сульфата) в хондроитинсульфате В или дерматанно-сульфате [67] имеется L-идуроновая, а не D-глюкуроновая кислота. В тромбоцитах имеется также значительное количество сиаловых кислот. По данным Вудсайда и Кохолати [69a], тромбоциты человека содержат 0,67% к сухому весу пентоз и металпентоз (главным образом, рибозы и фукозы), 4,2% гексоз, 0,1% глюкозамина, 2,57% галактозамина и 0,72% нейраминной кислоты. Соотношение между отдельными углеводными компонентами белков в бычьих тромбоцитах несколько иное. У различных ви-

дов животных обнаружены значительные различия в количестве углеводов, связанных с белками (гексоз, гексозаминов и т. д.) в тромбоцитах.

Как упоминалось выше, для выяснения функциональных особенностей гликопротеидов важно знать не столько качественный и количественный их состав, сколько тонкое строение их молекул, т. е. расположение и взаимосвязь между отдельными их компонентами. Наличие конечных углеводных остатков в молекулах определяет их высокую термостабильность [69]. Важные биологические свойства гликопротеидов определяются наличием и локализацией в их молекулах нейраминовой кислоты. Отщепление нейраминовой кислоты, не оказывая заметного влияния на константу седиментации гликопротеида, смещает его изоэлектрическую точку от рН 2,7 до рН 5 [70]. С наличием концевой нейраминовой кислоты связана резистентность гликопротеидов к действию протеолитических ферментов. Так, если в молекулах орозомукоида с помощью нейраминидазы отщепить нейраминовую кислоту, то расщепляемость его трипсином повышается. Аналогичное явление описано Готшалком [71, 72] при действии трипсина на гликопротеид подчелюстной железы (рис. 5).

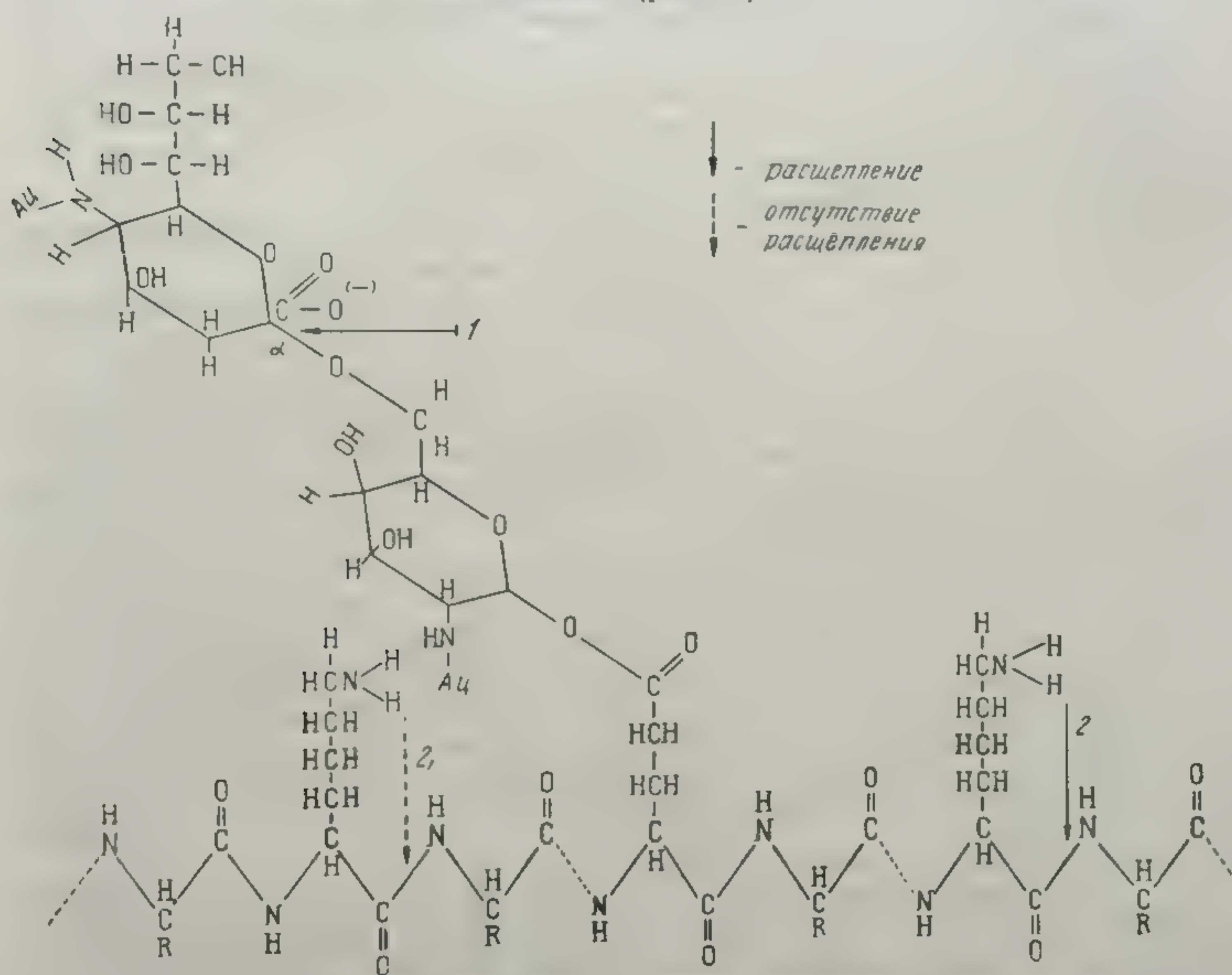


Рис. 5. Действие ферментов на участок молекулы гликопротеида.
1 — связи, расщепляемые нейраминидазой; 2 — связи, расщепляемые трипсином.

На рис. 5 показан участок протеида, в котором имеется нейраминовая кислота, препятствующая действию трипсина.

Отщепление других углеводных компонентов гликопротеида не оказывает влияния на его доступность ферментам [73]. Активность гормонов, являющихся гликопротеидами, также зависит от наличия в их молекулах конечных остатков нейраминовой кислоты.

Для того чтобы полностью инактивировать гонадотропин или гормон, стимулирующий образование фолликул, или эритропоэтин, достаточно с

помощью нейраминидазы отщепить от их молекул нейраминовую кислоту [74, 40, 42]. Эти факты представляют большой интерес, так как в данном случае прямыми опытами показано участие нейраминовой кислоты в процессе регуляции действия гормонов. Чрезвычайно интересный факт потери специфичности веществ групп крови М и N в результате действия нейраминидазы и отщепления нейраминовой кислоты был описан Е. Романовской [75].

Шульце и Швик [76] исследовали скорость превращения протромбина в тромбин и показали, что она в значительной степени возрастает, если протромбин предварительно обработать нейраминидазой. Если в процессе превращения протромбина в тромбин участвует трипсин [77], то весьма вероятно, что скорость реакции определяется наличием или отсутствием в молекулах протромбина конечных остатков нейраминовой кислоты и вследствие этого от доступности протромбина действию трипсина. Возможно, что нейраминовая кислота играет ту же роль в молекулах протромбина в отношении трипсина, что и в орозомукоиде. Однако биологическая активность гликопротеидов не всегда связана с наличием в ней нейраминовой кислоты. Так, например, отщепление нейраминовой кислоты от холинэстеразы меняет ее физико-химические свойства, но не оказывает влияния на ее энзиматическую активность [78].

Наличие в нейраминовой кислоте различных функциональных групп (кетон-, амин-, окси- и карбоксильной групп) определяет, по-видимому, ее роль как важнейшего звена, участвующего в комплексообразовании гликопротеидов крови с другими веществами.

Процесс комплексообразования лежит, по-видимому, в основе тормозящего действия некоторых гликопротеидов на ферменты.

Фенгши и Лясковски [83] выделили из бычьей крови гликопротеид, сходный по составу с овомукоидом [79], и показали, что это вещество, оказывающее тормозящее действие на трипсин, образует с ним стойкие комплексы. С плазмином и химотрипсином α этот же гликопротеид образует менее стойкие комплексы. Орозомукоид на действие протеолитических ферментов не оказывает тормозящего действия [80], между тем другие компоненты той же серомукоидной фракции крови являются ингибиторами трипсина.

Так, Гоа [80] выделил из крови человека серомукоидную фракцию и разделил ее на ряд компонентов, из которых лишь два обладали способностью тормозить действие трипсина. По содержанию углеводных компонентов эти гликопротеиды отличались от орозомукоида. Возможно, что именно различиями в строении углеводных компонентов объясняется взаимодействие с ферментами одних (ингибитор трипсина) и отсутствие взаимодействия других (орозомукоид) гликопротеидов. Тормозящее действие ряда гликопротеидов на гемагглютинацию вирусами эритроцитов также связано с процессом комплексообразования.

В основе этого процесса лежит конкуренция гликопротеидов сыворотки или других тканей с «рецепторами» эритроцитов, связывающими вирусы и также являющимися гликопротеидами. Во взаимодействии с вирусами участвует нейраминовая кислота гликопротеидов-рецепторов [81, 63].

Калган, Джонсон и Винцлер [82] выделили из стромы эритроцитов человека гликопротеиды-рецепторы. Оказалось, что в них имеется относительно высокое содержание фукозы. Интересный вопрос о роли фукозы во взаимодействии гликопротеида с вирусами еще совершенно не изучен, так же как вопрос о ее значении в γ -глобулинах.

Ряд чрезвычайно интересных работ относительно взаимодействия гликопротеидов с нуклеиновыми кислотами опубликован Ваинфельдом и Тунисом [85, 86]. Эти авторы показали, что орозомукоид, а также α_2 -гликопротеид обладают способностью предотвращать осаждение рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот трихлоруксусной кислотой. Меж-

ду тем предварительная инкубация гликопротеидов с пепсином или трипсином до смешивания с нуклеиновой кислотой лишает их способности взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами и тормозит их осаждение трихлоруксусной кислотой.

Ввиду того что эти гликопротеиды относительно устойчивы к действию протеолитических энзимов, авторы предполагают, что достаточно разрушить лишь небольшое число пептидных связей в их молекулах, чтобы лишить их способности взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами, подобно тому как достаточно в гликопротеиде разорвать незначительное число гликозидных связей, чтобы лишить его способности взаимодействовать с вирусом гриппа.

Имеются данные о важной роли процесса комплексообразования гликопротеидов с биотином, тироксином, витамином B₁₂ и другими биологически активными веществами [8].

Моретти и Ион [86] показали, что различные гаптоглобины, выделенные из сыворотки, а также из мочи человека, отличаются между собой по способности образовывать комплексы с гемоглобином. Между тем по химическому составу они весьма близки между собой. Весьма вероятно, что различия в их способности взаимодействовать с гемоглобином также зависят от особенностей строения и последовательности чередования углеводных и пептидных компонентов в их молекулах.

Дальнейшие исследования индивидуальных гликопротеидов, их строения, обмена, функциональных особенностей, а также взаимодействия с другими соединениями будут несомненно способствовать выяснению вопроса о причинах изменения их содержания в крови, наблюдаемые при различных заболеваниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Biserte G. Bull. Soc. Chim. biol., 1957, 39, Suppl., 111, 93.
2. Stary Z. Clin. chemistry, 1957, 3, 557.
3. Zlotnick A., Weisenberg E., Chowers M. J. Labor. Clin. Med., 1959, 54, 207.
4. Bogoch S. W. Congress. Clin. chem., 1960, 25.
5. Bourillon K. et Michon J. Bull. Soc. chim. biol., 1960, 42, 310.
6. Werner J. Acta Soc. Med. u. psala, 1959, 64, 353.
7. Montreil J. Bull. Soc. Chem. biol., 1957, 39, Suppl., 111, 3.
8. Bettelheim-Jevons E. Adv. of protein chem., 1958, 13, 35. New York.
9. Winzler R. In «Plasma proteins» ed. by Putman, 1960, 1, 309.
10. Winzler R. In Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides. New York, 1958, 108.
11. Kent P. a. Whitehouse M. Biochemistry of the Aminosugars. London, 1955.
12. Schultze H., Schmidtberger P., Haupt H. Bioch. Z., 1958, 329, 490.
13. Winzler R. Methods of Bioch. Analys. New York, 1955, 2, 279.
14. Kabat E. Blood groups substances. New York, 1956.
15. Kabat E. In Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of mucopolysaccharides. New York, 1958, 65.
16. Morgan W. Bull. Soc. chimie biol., 1961, 43, 1.
17. Watkins W. Bull. Soc. chimie biol., 1961, 43, 1.
18. Cheftel R., Cloare L., Moretti M., Rafellson M., Yayle M. Bull. Soc. chim. biol., 1960, 42, 993.
19. Bourillon K., Michon J. et Got. Bull. Soc. Chim. biol., 1959, 41, 493.
20. Blix G., Gottschalk A., Klink A. Nature, 1957, 179, 1088.
21. Kerby G. a. Langley A. J. of Labor and Clin. Med., 1959, 53, 708.
22. Comb D. a. Roseman S. J. biol. chem., 1960, 235, 2529.
23. Kerby G. J. Clin. Invest., 1958, 37, 962.
24. Bottiger L. a. Carlson L. Clin. chim. Acta., 1960, 5, 664.
25. Bono G., Negro N. Minerva Pediatrica, 1959, 11, 159.
26. Levendee L., Kanitz E., Erdos T. Beitr. Klin. Tuberk., 1959, 121, 447.

27. Kellen S. Die Eiweisszucker, Leipzig, 1960.
28. Цветкова И. В. Вопросы медицинской химии, 1961, 7, 3.
29. Костюковская О. М. и Жуков А. В. Вопросы медицинской химии, 1961, 7, 6.
30. Bottiger L. Clinica Chim. Acta, 1960, 5, 880.
31. Bollet A. Arch. of Intern. Medicine, 1959, 104, 159.
32. Bottiger L., Estborn E. Mollerberg Acta Soc., Medic. Upsal., 1960, 65, 72.
33. Deiss W., Holmes T. J. clin Invest., 1958, 37, 51.
34. Knedel M., Jacubeit M., Brunger P. Klin. W., 1960, 115.
35. Baccus A. J. Labora. Clin. Med., 1960, 55, 220.
36. Дубинский А. М. Вопросы медицинской химии, 1961, 7, 2.
37. Spiro R. J. biol. chem., 1959, 234, 742.
38. Schultze H., Gollner J., Heide K., Schonenberger M., Schwick H. Z. Naturforsch., 1955, 10, 463.
39. Jeanloz R. Bull. Soc. Chim. biol., 1960, 42, 303.
40. Rafelson M., Clausen H., Legault-Delmarl J. Biochim. et Biophys. Acta., 1961, 47, 406.
41. Got H., Bourillon R. et Michon. Bull. Soc. chim. biol., 1960, 42, 41.
42. Lowly P., Keigley G., Bersook H. Nature, 1960, 185, 102.
43. Rosse W. a. Gurney C. J. of Labora. Clin. Med., 1959, 53, 446.
- 43a. Gottschalk A., Whillen W. and Graham. Bioch. et Biophys. Acta, 1960, 38, 183.
44. Stacey M. Advancement of science, 1959, 16, 23.
45. Dische Z. In Ciba Foudation Symposium on the Chemistry and Biology of mucopolysaccharides. London, 1958, 263.
46. Dische Z. Feder. Proceed, 1960, 19, 904.
47. Rosevear J. a. Smith E. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 250.
48. Jeavons J. Nature, 1958, 181, 1346.
49. Каверзнева Е. Д. и Богданов Р. И. Биохимия, 1960, 26, 105.
50. Micheel F., Klocker W. Hoppe-Seyler. Z. Physiol. Chem., 1959, 315, 261.
- 50a. Розенфельд Е. Л., Костюковская О. М. Вопросы медицинской химии, 1961, 7, 6.
51. Bazzini S. et Delaunay E. Biologie. Medicale, 1959, 48, 4.
52. Scheinberg H., Morell A. J. Clin. Invest., 1957, 36, 1193.
53. Bostrom H., Roden L., Jamashina S. J. biol. chem., 1958, 230, 381.
54. Catchpol H. a. Engel Proc. Soc. Exp. biol. Med., 1959, 75, 221.
- 54a. Musil A. Clinica chemica Acta, 1961, 6, 508.
55. Schetia M., Foster J., Schetlar C. and Everett M. Cancer Research, 1949, 9, 515.
56. Beloff-Chain A. a. Pocchiari T. Ann. Rev. Biochem., 1960, 29, 295.
57. Spiro R. J. biol. Chem., 1959, 234, 742.
58. Wolf G. a Varrandani A. Bioch. et Biophys. Acta, 1960, 43, 501.
59. Moretti A., Wolf G. Biochim. et Biophys. Acta, 1961, 46, 392.
- 59a. Moretti A., Wolf G. Biochim. Biophys. acta, 1961, 53, 203.
60. Meyer K. a. Hoffman P. Arzneimittelforschung, 1960, 5, 379.
61. Segal S. a. Topper J. Bioch. et Biophys. Acta, 1960, 42, 147.
62. Levvy G. Nature, 1960, 186, 472.
- 62a. Levvy G., McLean A. Biochem. J., 1961, 80, 2.
63. Gottschalk T. The chemistry and Biology of Sialic Acid., 1960, Cambridge.
64. Товарницкий В. И. Итоги науки, 1961, 4, 127.
65. Warren L., Spearing C. Biochem. Biophys. Research, Communication. 1960, 3, 489.
66. Davidson E. a. Riley J. J. Biol. Chem., 1960, 235, 3367.
67. Jeanloz R. Bull. soc. Chim. biol., 1961, 43, 1.
68. Gottschalk A. Nature, 1960, 186, 449.
69. Osaki S. J. of Biochem. (Japan), 1960, 48, 190.
- 69a. Woudside E. a. Kocholaty. Blood., 1960, 16, 1173.
70. Попеное Е. а. Drew R. J. biol. chem., 1957, 228, 679.
71. Gottschalk A. a. Fazekas S. Bioch. et Biophys. Acta, 1960, 43, 513.
72. Graham E. a. Gottschalk A. Bioch. et Biophys. Acta, 1960, 38, 513.
73. Schmidt K., Benzre W., Nusbaumer T., Wehrmuller J. J. Biol. Chem., 1959, 234, 529.
74. Nedler C. a Reisfeld R. J. of Labor and Clin. Med., 1960, 56, 258.
75. Romanowska E. Naturwissenschaften, 1960, 3, 66.
76. Schultze H. a. Schwick. Clin. chim. Acta, 1959, 4, 15.
77. Белик Н., Ходорова Е. Киев, 1957, 85.
78. Svenmark O. Acta physiol. Scand., 1961, 52, 267.

79. Weil L. and Timashewich. Arch. Biochem. et Biophys., 1960, 87, 134.
80. Goa J. Acta Chem. Scand., 1960, 14, 1790.
81. Бычков С. М. Успехи современной биологии, 1960, 49, 3.
82. Kalhan R., Johnson C. a. Winzler R. Acta soc. Med. Upsal., 1959, 64, 290.
83. Feng. Chi W., Laskowski M. J. Biol. Chem., 1960, 235, 1680.
84. Tunis M. a. Weinfeld H. Arch. of Bioch. and Biophys., 1960, 87, 210.
85. Weinfeld H. a. Tunis M. J. biol. chem., 1960, 235, 1668.
86. Moretti J. a. Jon J. Bioch. et Biophys. Acta, 1961, 46, 545.
-

ГЛАВА III

ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. ХИМИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В. С. Тонгур

В последнее время прилагается много усилий для установления строения и свойств нуклеиновых кислот. В настоящем сообщении сделана попытка обобщить некоторые результаты исследований, проведенных в данной области. Прежде всего мы остановимся на материалах, касающихся строения и свойств нуклеопротеидов.

В 1953 г. Уотсон и Крик предложили модель молекулы ДНК, которая теперь является общепринятой. По этой модели [1] ДНК представляет собой две правовращающие спиральные цепи с шагом, равным 34 Å, и диаметром в 20 Å. Каждая цепь построена из нуклеотидов, соединенных между собой фосфодиэфирными связями. Азотистые основания находятся внутри двойной спирали, а фосфатные группы — снаружи, так что атомы фосфора одной спирали расположены в одной плоскости с атомами фосфора другой (рис. 1).

Нуклеотиды следуют вдоль длинной оси спирали через каждые 34 Å, угол поворота каждого последующего нуклеотида равен 36°; таким образом, структура повторяет себя через каждые 10 нуклеотидов, т. е. на расстоянии 34 Å. Плоскости азотистых оснований расположены перпендикулярно к оси спирали и они соединяются в пары при помощи водородных связей. Так как пурины больше пиримидинов, то по стерическим условиям обычно пары образуются из нуклеотида, содержащего пурин, и нуклеотида, содержащего пиримидин. В ДНК существуют только две пары оснований аденин-тимин и гуанин-цитозин, причем первая пара связана двумя водородными связями, а вторая — тремя (рис. 2). Это создает неравноценность структуры вдоль оси молекулы ДНК.

Из такого строения ДНК вытекает так называемое правило Чаргаффа, согласно которому количество пуринов в молекуле ДНК должно равняться количеству пиримидинов. Образование пар из нуклеотидов, имеющих в составе два пурина, невозможно; они, грубо говоря, «не уместятся» в пространство между двумя спиралями, а нуклеотиды, содержащие два пиримидина, будут слишком «малы». Практически, по-видимому, бывают такие случаи, когда азотистое основание одной спирали не соответствует азотистому основанию другой цепи, а значит, и не может образовать с ним пару. Тогда, по всей вероятности, одна из цепей изгибается, образуя петлю, величина которой определяется количеством «непарных» нуклеотидов в данном отрезке цепи. Однако молекула ДНК не всегда является двухспи-

ральной. Совсем недавно Синсхеймер [2] обнаружил, что особого вида фаги содержат односпиральную молекулу ДНК.

Точный молекулярный вес молекулы ДНК неизвестен. Он колеблется в зависимости от метода выделения в пределах от 6 до 12 млн. Но представляют ли эти огромные молекулы ДНК единую молекулу или они состоят из субъединиц (субмолекул) меньших размеров — пока неясно [3]. На основании ряда экспериментальных данных мы можем предполагать существование субмолекул. В 1960 г. в лаборатории Садрона в Страсбурге был поставлен следующий опыт [4]. Высокополимерную ДНК подверга-

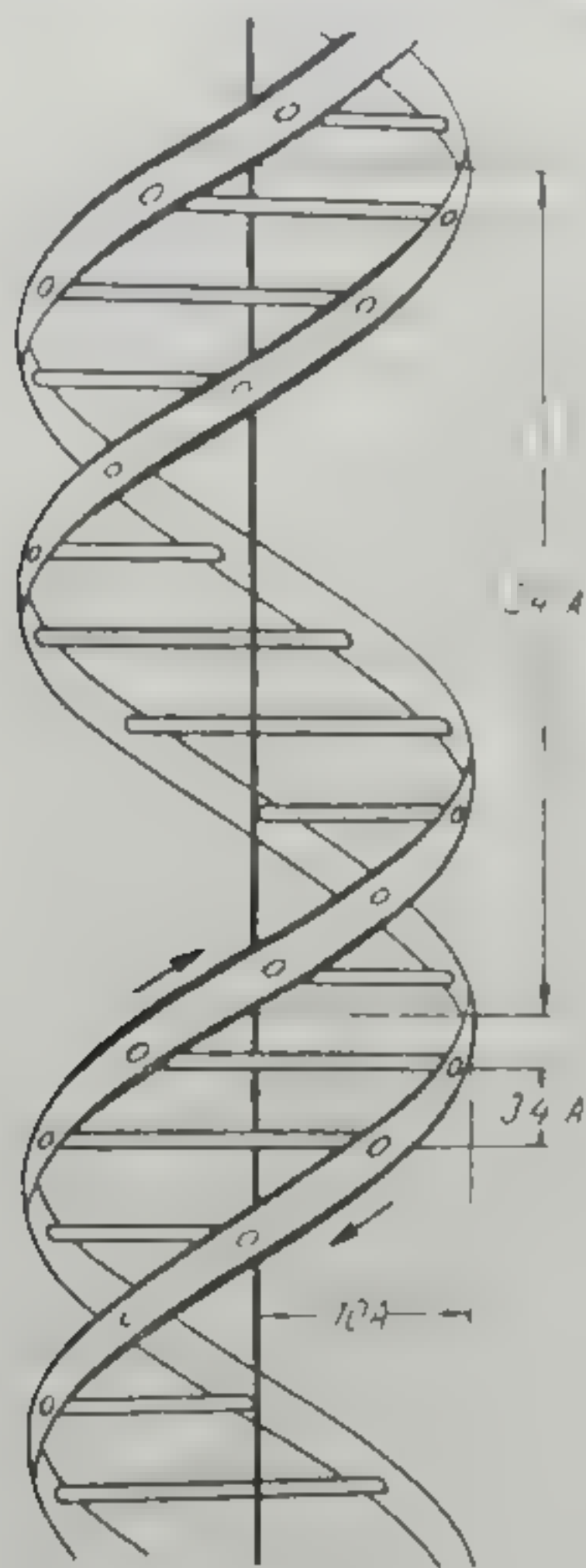


Рис. 1. Схема строения ДНК.

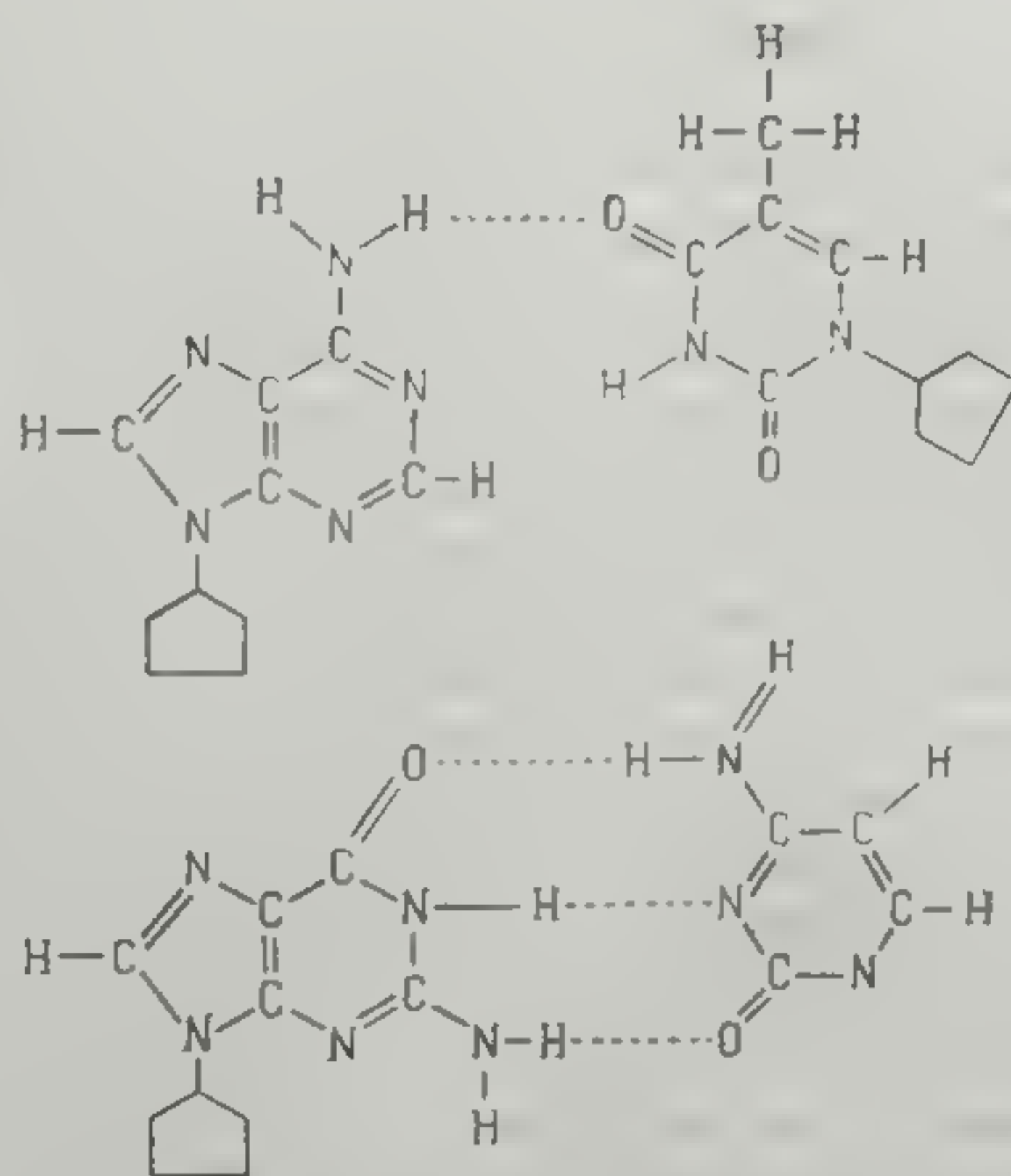


Рис. 2. Способ связи пуринов с пиримидинами в молекуле ДНК.

ли действию дезоксирибонуклеазы. В течение нескольких минут она распадалась под влиянием этого фермента на фрагменты с молекулярным весом порядка 500 000 — 600 000. Однако затем дальнейшая деградация их не шла, несмотря на то что инкубация продолжалась в течение суток. На основании этих опытов Садрон приходит к выводу, что субмолекулы существуют. Однако далеко не все авторы разделяют эту точку зрения. Доти [5], например, считает ДНК единой молекулой.

Итак, первичная структура молекулы ДНК представляет собой спирально изогнутую цепь соединенных ковалентными связями нуклеотидов.

Вторичная структура — это двухспиральная макромолекула, возможно составленная из субмолекул с разрывами вдоль цепи главных валентностей обеих спиралей. Структура в этих местах поддерживается водородными связями. Третичная структура — специфически уложенная двойная спираль.

Если принять молекулярный вес ДНК равным $6 \cdot 10^6$, то длина такой двойной спирали должна равняться 30 000 Å, т. е. она оказывается значительно больше величины ряда биологических структур, в состав которых входит молекула ДНК. Остается предположить, что двойная спираль имеет свернутую специфическую конфигурацию.

Предполагается, что ДНК представляет собой довольно жесткую конструкцию благодаря огромному количеству присутствующих в ней водородных связей. Равновесная конфигурация молекулы ДНК определяется соотношением, с одной стороны, сил, растягивающих молекулу (это в основном отрицательные заряды остатков фосфорной кислоты, расположенные вдоль основной цепи), и, с другой стороны, водородными связями, а также силами ван дер Ваальса, обуславливающими тенденцию к сокращению молекулы и облегчающими энтропийное свертывание, имеющее своим пределом форму беспорядочного клубка, статистически наиболее вероятного.

Образование двойной ДНК подобной спирали является, по-видимому, свойством, присущим полинуклеотидным цепям. Полученные искусственно тяжи полиаденина и полиурацила при их смешении в растворе в присутствии небольшого количества ионов двухвалентных металлов (Mg или Mn) спонтанно образуют двойную спираль. Если к раствору образовавшейся таким образом двойной спирали добавить дополнительное количество полиурацила, то образуется трехтяжевая спираль.

Каковы же свойства жесткой макромолекулы ДНК?

Во-первых, спиралеобразная молекула ДНК может находиться в двух конфигурациях: сжатой кристаллической структуре А и слегка растянутой паракристаллической форме В. Структура А существует при низкой относительной влажности (для Na соли $< 75\%$). В растворе молекулы ДНК находятся в В конфигурации.

Во-вторых, раствор ДНК в воде имеет специфический максимум поглощения в ультрафиолетовой части спектра при длине волны, равной 260 мμ. В нативной ДНК образование пар приводит к уменьшению поглощения. При разделении двух спиралей, переходе их в беспорядочное состояние, деградации молекулы ДНК оптическая плотность возрастает примерно на 40%. Это явление называется гиперхромическим эффектом. Определение гиперхромизма ДНК является одним из критериев оценки влияния внешних воздействий на изменение структуры ДНК [6].

В-третьих, процесс денатурации ДНК имеет свои особенности [5], отличающие его от денатурации белков. На этом вопросе мы остановимся несколько подробнее.

При тепловой денатурации при температуре 85—100° происходит разделение двухспиральной молекулы ДНК на две односпиральные молекулы и молекулярный вес исходной ДНК снижается вдвое. Этот процесс, являющийся фазовым переходом, Доти назвал молекулярным плавлением. Его можно наблюдать с помощью гиперхромического эффекта. Однако подобное разделение спиралей происходит только в случае низкой ионной силы растворителя, когда отталкивание между отрицательно заряженными цепями достаточно велико. Если же ионная сила раствора велика, то при его охлаждении спирали будут агрегировать, соединяться между собой, перепутываться, но не специфически, в результате чего образуются неправильные, спутанные клубки.

Возникает вопрос, можно ли ренатурировать денатурированную и разделенную на половинки молекулу ДНК? Как следует из данных Доти, это можно сделать [7]. Для доказательства ренатурации было использовано определение трансформирующей активности ДНК. Нативная ДНК, выделенная из мутантов микробов и добавленная к обычной культуре, может ее трансформировать, превращать в мутантный тип. Если такую ДНК, обладающую трансформирующей способностью, нагреть до 100° в течение 10 минут и быстро охладить, то активность ее исчезает. Если же раствор нагретой ДНК остывает медленно, то начинается восстановление трансформирующей активности ДНК, достигающей максимума 50% от исходной при температуре 65°.

Применяя меченые по азоту ДНК и определение трансформирующей активности, удалось показать, что может происходить соединение двух спиралей разных ДНК, полученных из нормальной и мутантной ДНК. Этот феномен удается наблюдать, даже применяя ДНК из генетически близких видов микробов. В данном случае образуются гибридные молекулы ДНК, в которых спирали имеют разное происхождение. Подобная ренатурация, как считает Доти, осуществима лишь в случае вирусной и бактериальной ДНК. Эти организмы содержат небольшое количество молекул ДНК, что обуславливает большую возможность «нахождения» каждой спирали недостающей для нее специфической второй спирали. Если же взять ДНК, выделенную из высших организмов, то так как в этом случае количество молекул ДНК очень велико (несколько миллионов), возможности «нахождения» друг друга комплементарными спиралями весьма малы и ренатурация не будет происходить. Эти предположения находят подтверждение в соответствующих экспериментах.

ДНК никогда не встречаются в организме (за исключением фага) в свободном виде. Обычно они существуют в виде нуклеопротеидов, входящих в состав хромосом. Последние имеют в своем составе как дезокси- так и рибонуклеопротеиды.

Что касается белкового компонента дезоксирибонуклеопротеидов, то данные, относящиеся к характеристике этой части нуклеопротеидов, достаточно противоречивы. При современном уровне препаративной техники мы всегда имеем дело со смесью нуклеопротеидов, состоящих из ДНК и белков различного химического состава. Следует также учитывать и возможность реассоциации ДНК и белков в процессе выделения. Пока только известно [3], что в состав нуклеопротеидов входят главным образом основные белки типа гистонов и протаминов, около 7—9% белков нуклеопротеидов значительно более прочно связаны с ДНК — они представляют собой в отличие от гистонов кислые триптофансодержащие белки, возможно, липопротеины. Гистон, находящийся в нуклеопротеиде, удается хроматографически разделить на ряд фракций. Доказано, что менее прочно связанные гистоны более богаты лизином и более низкомолекулярны (молекулярный вес 8000 — 9000); более прочно связанные фракции богаты аргинином и имеют больший молекулярный вес (около 35 000).

Анализ количественных соотношений отдельных фракций дезоксирибонуклеопротеида (ДНП) из зубной железы показал, что он содержит 42% ДНК и 58% белков, из них прочно связанного 9% и гистонов 49%, из которых на долю высокомолекулярного гистона приходится 31% и низкомолекулярного 18%.

По-видимому, некоторая часть белков располагается на молекуле ДНК в виде полностью вытянутой спирали, образуя участки как бы трехтяжевой структуры. Однако, как показывают расчеты, таким образом может расположиться очень небольшое количество белка порядка 20—25%. Расположение другой части белков остается до сих пор неясным.

Строение рибонуклеопротеидов изучено, пожалуй, еще в меньшей степени, чем дезоксирибонуклеопротеидов. Это объясняется отчасти тем, что только недавно были разработаны методы выделения полимерной нативной РНК. В настоящее время установлено, что молекула РНК в отличие от молекулы ДНК имеет однотяжевую структуру. Так как жесткость молекулярных структур является, по-видимому, необходимым условием для координации пространственно временных процессов, идущих в биологических системах, то можно думать, что и молекулы РНК, активно участвующие в ряде биохимических процессов, должны быть не слишком лабильны в конфигурационном отношении. Способность цепи РНК образовывать различные конфигурации должна быть в определенной степени

ограничена. Вместе с тем, согласно экспериментальным данным, РНК значительно более гибка, чем ДНК. Так, например [8, 9], при нагревании полимерной РНК в пределах $40-60^\circ$ происходит значительный подъем вязкости, отвечающий изменению конфигурации РНК, увеличение коэффициента экстинкции, связанного с количественным изменением Н-связей в молекуле, и довольно резкое изменение величины оптического вращения (последний параметр указывает степень спирализации цепей). В этих же условиях ДНК остается неизменной. Подобная разница наблюдается у РНК и ДНК по отношению к изменению ионного состава среды, по отношению к изменению рН и т. д. Указанные физико-химические изменения РНК при нагревании объясняются соответственно разворачиванием цепи, свернутой в клубок, уменьшением числа водородных связей и уменьшением спиральных участков, которые образуются при спаривании оснований. Таким образом, можно считать установленным, что в молекуле РНК, так же как и в ДНК, имеют место Н-связанные участки цепей и спиральная конфигурация. Вместе с тем, как указывалось выше, РНК более лабильна в конфигурационном отношении. Необходимо отметить, что молекула РНК значительно более компактно упакована, чем молекула ДНК. Так, например, при молекулярном весе примерно 2×10^6 среднее квадратичное расстояние между концами молекулы РНК равно $800-900 \text{ \AA}$, соответствующая величина, относящаяся к ДНК, равна $2500-3000 \text{ \AA}$, т. е. в молекуле РНК имеются какие-то гибкие участки, позволяющие принимать более компактную конфигурацию. Таким образом, можно предположить следующее: а) в молекуле РНК имеют место участки с Н-связями между азотистыми основаниями; б) наиболее вероятно, что в этих участках образуются двойные спирали; это говорит о значительной жесткости отдельных областей в молекуле РНК; в) в молекуле РНК имеются участки, обеспечивающие достаточную гибкость молекулы: вероятнее всего это места, где происходит единичная цепь РНК, т. е. сама структура РНК позволяет сочетать в молекуле значительную жесткость со значительной подвижностью. Исходя из сказанного, в настоящее время наиболее распространенной является модель РНК (рис. 3), позволяющая объяснить известные свойства РНК.

Весьма важен вопрос о соотношении конфигураций, размеров и молекулярных весов молекул РНК *in vitro* и в тех биоструктурах, откуда РНК выделена. Здесь, по-видимому, следует дифференцировать РНК по объектам, из которых она выделяется. Так, например, вирусная РНК из ВТМ (наиболее детально обследованный объект) *in vivo* и *in vitro* имеет разные размеры. При помощи рентгеноструктурного анализа установлено, что РНК в составе вируса располагается спиралью, имеющей высоту порядка $2000-3000 \text{ \AA}$, т. е. высота спирали соответствует длине вирусной частицы: *in vitro* молекула скручивается, принимает более компактную упаковку.

Молекулярный вес вирусной РНК около 2×10^6 . Падение молекулярного веса приводит к инаktivации РНК, что, по-видимому, свидетельствует о том, что нативная молекула РНК в этом случае имеет молекулярный вес именно $1,8 \times 10^6$. В других естественных нуклеопротеидах — рибосомах, на строении которых мы остановимся ниже, присутствуют две молекулы РНК с разным молекулярным весом. Одна большая имеет молекулярный вес около $1\,200\,000$, а другая — около $600\,000$. Пока не известно, соединены ли между собой эти две молекулы, и если соединены, то каким образом.

Переходя к рассмотрению данных о строении рибонуклеопротеидов, следует указать на биологическую активность этих комплексов. К рибонуклеопротеидам относится большая группа мелких вирусов, таких, как

вирус табачной мозаики, желтой мозаики турнепса, полиомиелита и др. Их строение хорошо изучено. Однако существует другой вид естественных нуклеопротеидов, обладающих не менее интересными свойствами, чем вирусы (мы не рассматриваем здесь рибонуклеопротеиды хромосом, так как

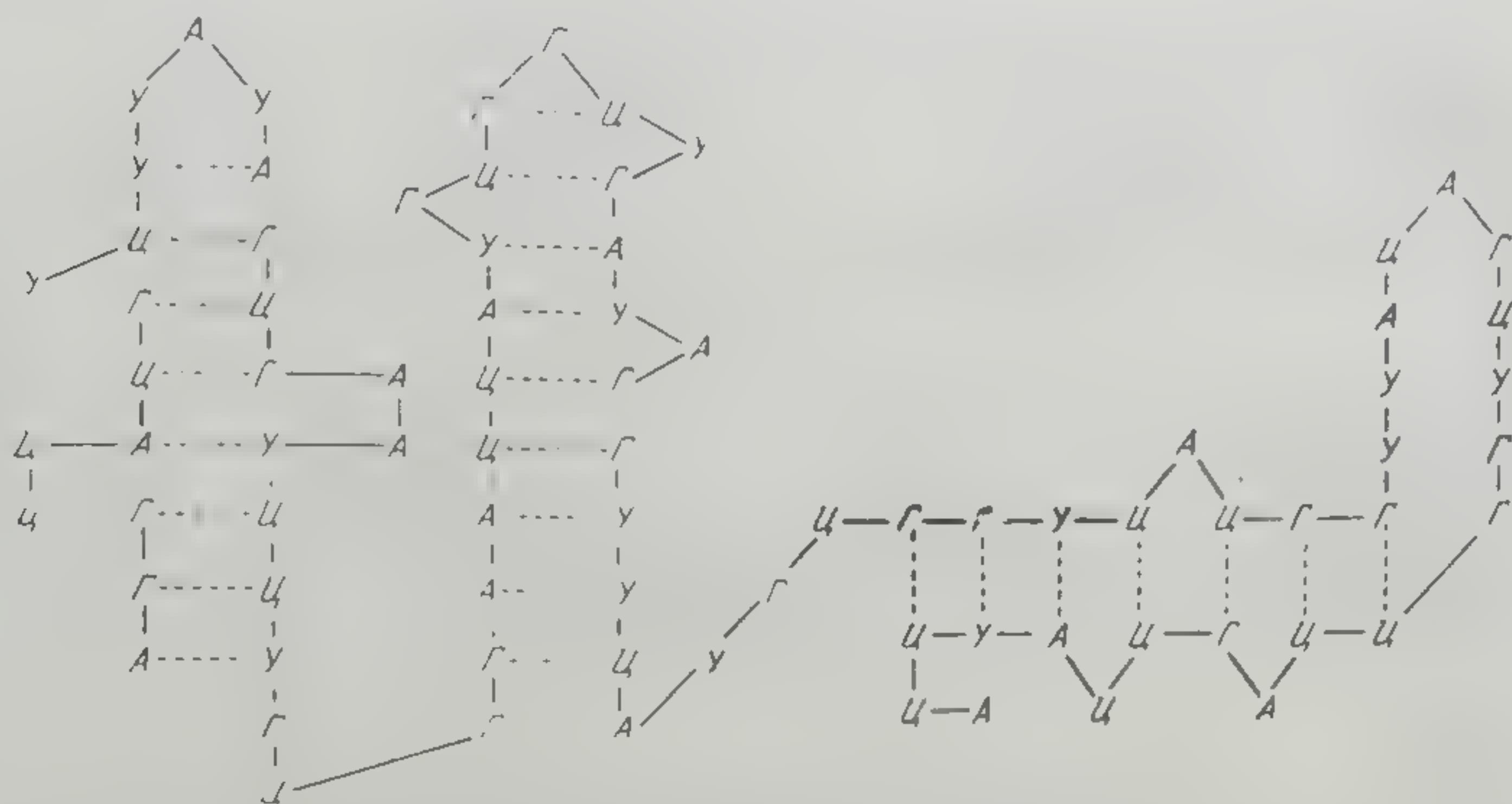


Рис. 3. Схема строения РНК.

А — адениннуклеотид; Г — гуаниннуклеотид; У — уридиннуклеотид; Ц — цитидиннуклеотид.

они почти не изучены, а имеем в виду рибосомы). Эти рибонуклеопротеидные частицы удается обнаружить во всех структурных элементах клетки: в ядре, по-видимому, в митохондриях и в цитоплазме, где они агрегированы с помощью липопротеидов в виде микросом и освобождаются после обработки последних дезоксихолатом. Рибосомы находятся также в микроорганизмах. 80—90% клеточной РНК приходится на рибосомы. Биологическое значение этих рибонуклеопротеидов заключается в том, что они являются местом, где происходит завершающий этап синтеза белка. Рибосомы представляют собой образования, стабильные в присутствии определенной концентрации ионов двухвалентных металлов и прежде всего Mg. С понижением концентрации Mg происходит сначала обратимый распад рибосом на субъединицы разной величины, но не меньше, чем 30, 50 s. Дальнейший распад уже необратим и он может идти до появления частиц, имеющих константу седиментации около 5 s и молекулярный вес порядка нескольких десятков тысяч. Причем субъединицы (имея в виду обратимо диссоциирующие компоненты), хотя и сохраняют исходные соотношения белка и РНК, обладают разной активностью в отношении биосинтеза белков. Некоторые данные о рибосомах из различных биологических объектов приведены в табл. 1, взятой нами из обзора Хогленда [10].

Состав азотистых оснований субъединиц рибосом, выделенных из *E. coli*, приведен в следующей табл. 2, взятой из статьи Робертса [11].

Состав белкового компонента рибосом еще недостаточно ясен. Молекулярный вес белковых единиц, входящих в состав рибосом, равен 12 000. Хроматографический анализ указывает на значительное содержание в этих белках аргинина, глутамина и лизина, чем они несколько напоминают гистоны и протамины, но в отличие от них белки рибосом содержат довольно много тирозина и других аминокислот, не имеющих основного характера [10, 13].

Таблица 1

Свойства рибосом из различных объектов

Свойства	E. coli	E. Vinelandii	Дрожжи	Горох	Ретикулоциты	Печень
Константа седиментации частицы максимального размера при оптимальной концентрации Mg^{++} (в единицах Сведберга)	70	86	80	80	80	78
Молекулярный вес	$2,8 \cdot 10^6$	—	$4,1 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$	—
Диаметр в Å	—	250	240	350	—	150
% РНК	60	—	42	40	50	40
% белка	40	—	58	60	50	60
Ионы, соединяющие субъединицы	Mg	Mg	Mg	Mg+Ca	—	—
Константа седиментации продуктов обратимой диссоциации (в единицах Сведберга)	51; 32	58; 39	60; 40	60; 40	—	62; 46

Таблица 2

Основания	Частицы 50 s	Частицы 30 s	Примечание
Цитозин	22,2	21,0	Точность определения $\pm 3\%$
Аденин	24,2	26,4	
Гуанин	30,4	34,1	
Урацил	23,1	18,5	

Большой интерес представляет вопрос о наличии ферментов в составе белков рибосом. Данные по этому вопросу еще не ясны, в частности, высказывается предположение, что присутствие ферментов в составе рибосом объясняется недостаточно тщательной их отмывкой.

Mg — третий компонент рибосом, выполняет, по-видимому, три функции: он участвует в соединении субъединиц РНК между собой, принимает участие в соединении РНК со структурным белком и, вероятно, со вновь синтезируемым белком. Вопрос о структуре рибосом является одним из интереснейших в современной биохимии, так как его выяснение в значительной степени продвинет понимание механизма заключительных этапов синтеза белков.

К изучению данного вопроса пытались подойти, переваривая частицы рибонуклеазой и протеазами [14]. Оказалось, что в первом случае наблюдалась деградация РНК, белок же оставался почти неизменным. При действии протеаз наряду с распадом белка отмечалась почти полная деградация РНК. Эти данные свидетельствуют о том, что белок поддерживает полимерность и структуру РНК; с другой стороны, на РНК рибосом есть свободные от белка участки, которые атакуются рибонуклеазой. Другими авторами установлено [15], что свободная РНК связывает на 30% больше Mg, чем РНК, находящаяся в рибосомах, а так как Mg связывается фосфатной группой, то это говорит о том, что в рибосоме часть фосфатных групп может быть связана с белком. С другой стороны, опыты по влиянию мочевины на рибосомы указывают на то, что в соединении белка с РНК в рибосомах прини-

мают участие водородные связи, так как под влиянием мочевины рибосома распадается на РНК и белок.

Согласно экспериментам [10, 16], около одной трети водородных связей РНК, не участвующих в образовании спирализованных участков структуры, участвует в образовании связи с белком, который, таким образом, по-видимому, расположен на неспирализованных участках субъединиц РНК. По данным нашей лаборатории, определенная конфигурация полимерной РНК обуславливает и количество присоединяющегося к ней белка. Итак, мы видим, что в построении рибосом участвуют Mg, электростатические связи между фосфатными группами РНК и основными группами белка и водородные связи. Весьма вероятно, что часть РНК находится на поверхности рибосом [17]. Построить на основании приведенных данных достаточно рациональную модель рибосом в настоящее время вряд ли возможно.

Мы рассмотрели данные о физико-химических свойствах биологических структур, играющих важнейшую роль в обмене веществ. Хотя теперь нам известно о них еще далеко не все, однако прогресс наших знаний в этом вопросе просто поразителен, так как о строении этих структур и их свойствах всего 10 лет назад ничего не было известно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Watson J. D., Crick F. H. C. *Nature*, 1953, 171, 737.
2. Sinsheimer R. L. *J. Mol. Biol.*, 1959, 1, 37.
3. Спитковский Д. М., Тонгур В. С., Дисклина Л. С. *Биофизика*, 1958, 3, 129.
4. Bernardi G., Champagne M., Sadron C. *Nature*, 1960, 188, 228.
5. Доти П. *Вестник АН СССР*, 1960, № 9, 24.
6. Спитковский Д. М., Цейтлин П. И., Тонгур В. С. *Биофизика*, 1960, 5, 1.
7. Doty P., Marmur I., Eigner J., Schildkraute C. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1960, 46, 461.
8. Спирин А. С., Гаврилова Л. А., Бреслер С. Е., Люсевицкий М. И. *Биохимия*, 1959, 24, 938.
9. Fresco J. R., Alberts B. M., Doty P. *Nature*, 1960, 188, 98.
10. Hoagland M. *The Nucleic Acids*, 1960, 3, 349.
11. Roberts R. B. *Annal. New York Acad. Sci.*, 1960, 88, Art. 3, 752.
12. Ping-yao Cheng. *Bioch. Biophys. Acta*, 1960, 37, 238.
13. Butler J. A. V., Cohn T., Simson P. *Bioch. Biophys. Acta*, 1960, 38, 386.
14. Roth J. S. *Fed. Proc.*, 1958, 17, No 1, p. 1, 300.
15. Edelman I. S., T'so T. O. P. a. Vinograd J. *Bioch. Biophys. Acta*, 1960, 43, 393.
16. Elson D. *Bioch Biophys. Acta*, 1959, 36, 362.
17. Petermann M. L. a. Hamilton M. G. *Protein Biosynthesis*, 1961, p. 233.

2. БИОХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

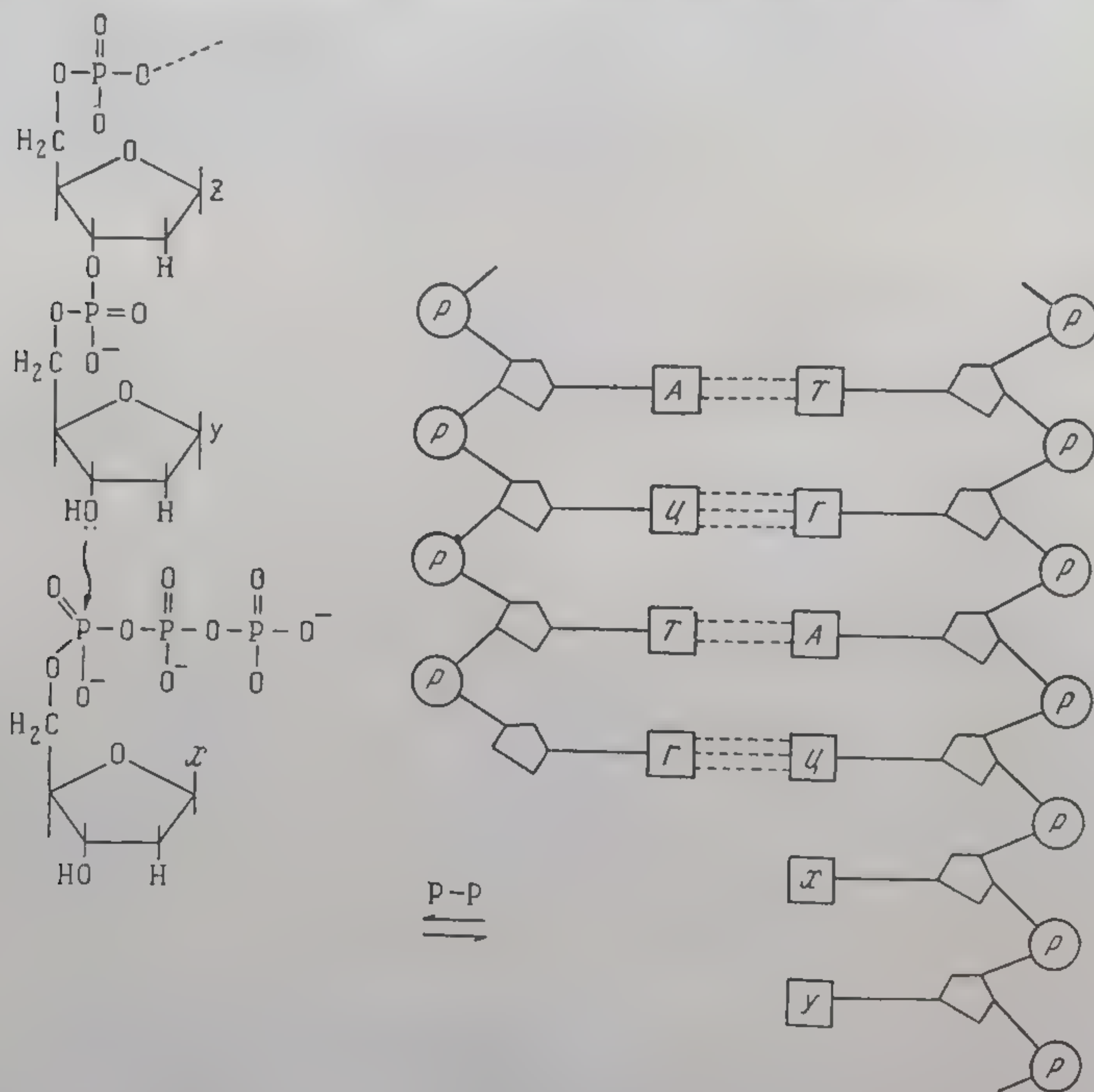
В. С. Тонгур

БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В настоящее время известно несколько систем, синтезирующих полинуклеотиды: 1) система Корнберга, синтезирующая ДНК из нуклеозидтрифосфатов с помощью полимеразы; 2) система Очоа, синтезирующая полинуклеотиды типа РНК из нуклеозиддифосфатов с помощью полинуклеотидфосфорилазы; 3) системы, синтезирующие РНК из нуклеозидтрифосфатов.

Несколько лет назад Корнбергом с сотрудниками была выделена из *E. coli* полимераза, синтезирующая ДНК в присутствии четырех нуклеозидтрифосфатов и полимерной ДНК, выполняющей функцию затравки, причем в этой роли может выступать ДНК любого происхождения. Все это время указанная система интенсивно изучалась главным образом в лабораториях Корнберга и Боллума. Установлено, что синтез ДНК идет путем наращивания цепи при присоединении нуклеозидтрифосфата с выделением пирофосфата.

Как видно из приведенной ниже схемы, нуклеозидфосфат присоединяется к находящейся в 3-м положении гидроксильной группе дезоксирибозы. Реакция эта определяется свойствами оснований образовывать соединенные водородными связями пары между затравочной ДНК и нуклеотидами, добавленными в качестве субстрата. Механизм подобной энзиматической репликации может быть изображен следующим образом.



Указанные реакции обратимы. При использовании неочищенных ферментных фракций преобладают деструктивные процессы и только в присутствии очищенного в несколько тысяч раз препарата осуществляется синтез ДНК.

В пользу такого рода представлений о механизме синтеза ДНК Корнберг приводит следующие доказательства: 1) физические свойства вновь синтезированной ДНК (молекулярный вес, поведение при нагревании и при действии дезоксирибонуклеазы) не отличаются от обычной; 2) нуклео-

зидтрифосфаты, имеющие в своем составе аналоги азотистых оснований, включаются в строго определенном порядке; так, например, 5-метилцитозин включается на место цитозина; 3) химическое строение вновь синтезированной ДНК практически идентично химическому строению затравочной ДНК, как видно из табл. 1.

Таблица 1
Сравнительный состав азотистых оснований затравочной и вновь синтезированной ДНК по Корнбергу [1]

Источники затравки	А	Т	Г	Ц	$\frac{А+Г}{Г+Ц}$	$\frac{А+Т}{Г+Ц}$
ДНК <i>E. coli</i> (затравка)	1,06	0,97	0,98	1,05	0,98	0,97
Синтезированная ДНК	1,04	0,96	0,97	0,98	1,01	1,02
ДНК тимуса (затравка)	1,14	1,05	0,90	0,85	1,05	1,25
Синтезированная ДНК	1,12	1,08	0,85	0,85	1,02	1,29
ДНК фага (затравка)	1,31	1,32	0,67	0,70	0,98	1,92
Синтезированная ДНК	1,33	1,29	0,69	0,70	1,02	1,90

Молярные соотношения нуклеотидов в синтезированной ДНК не удается нарушить изменением молекулярных концентраций нуклеотидов-субстратов. Если взять в качестве затравки искусственно синтезированный поли А-Т, то, несмотря на присутствие в системе всех 4 нуклеозидтрифосфатов, ничего, кроме поли А-Т, не синтезируется. Для синтеза ДНК показана необходимость всех четырех нуклеозидтрифосфатов и затравочной ДНК.

Изучение последовательности расположения оснований в затравочной и реплицированной ДНК показало, что в последней удается обнаружить все возможные 16 динуклеотидов и что энзиматическая репликация основана на образовании пар азотистых оснований: аденин-тимин, гуанин-цитозин.

Вопрос о механизме синтеза ДНК имеет большое общебиологическое значение. ДНК является генетическим фактором, и выяснение способов ее воспроизводства подводит нас к раскрытию механизмов наследственности. Поэтому лаборатория Корнберга приложила поистине титанические усилия для выяснения всех вопросов синтеза ДНК. Конечно, особенно важен в этом аспекте вопрос о роли затравки-матрицы в синтезе. В каком виде она должна выступать? Обязательна ли ее полимерность? По этим вопросам в последнее время получены новые данные. Так, выяснилось, что двухспиральная ДНК не может служить затравкой [1, 2, 3]. Молекула ДНК должна быть в какой-то мере частично видоизмененной таким образом, что возникает односпиральный участок со свободными водородными связями. Интересно в связи с этим отметить, что при инфицировании фагом микробной клетки двухспиральная ДНК фага распадается на две односпиральные половины. Более того, установлено, что роль затравки при синтезе ДНК могут выполнять кислоторастворимые олигонуклеотиды [1, 4], причем длина цепи затравки не является критическим фактором в синтезе. Корнбергу недавно [5] удалось наблюдать синтез поли А-Т нуклеотида *in vitro* в отсутствие вообще какой-либо затравки. При инкубации всех четырех нуклеозидтрифосфатов с ферментом после длительного лаг-периода наблюдается

образование поли А-Т, который затем уже и служит затравкой. По мнению Корнберга, данные условия реакции были благоприятны для образования А-Т олигонуклеотидов, которые затем автокаталитически репродуцировались. О значении этих опытов говорить еще рано; во всяком случае, вероятно, они приведут к попыткам синтезировать ДНК без затравки.

Следует указать, что полимеразы, осуществляющие синтез ДНК, получены не только из микроорганизмов, но и из животных тканей (регенерирующей печени, тимуса телят, карциномы Эрлиха, гепатомы Новикова и т. д.).

Несколько ранее Корнберга Очоа и Грюнберг-Маного выделили фермент, названный ими полинуклеотидфосфорилазой, синтезирующий полирибонуклеотиды из нуклеозиддифосфатов по следующей схеме:



Оказалось, что полинуклеотидфосфорилаза способна катализировать синтез как полинуклеатидов, содержащих какое-либо одно основание, например, полиаденилата, так и полинуклеотидов, содержащих два и более азотистых основания. Итог синтеза целиком зависит от состава субстрата; никакой затравки для синтеза, по всей вероятности, не нужно. Правда, препараты полинуклеотидфосфорилазы, полученные в настоящее время, не являются чистыми. Не исключена возможность, что они содержат какое-то небольшое количество полинуклеотидов, однако последние, по всем данным, не влияют на специфичность синтеза (не выполняют роль матрицы-затравки). Обычно при синтезе полинуклеотида полинуклеотидфосфорилазой необходим определенный лаг-период. Этот лаг-период исчезает, если к синтезирующей системе добавить олигонуклеотиды. Вероятно, в течение лаг-периода и происходит их образование. В этом случае, так же как и в системе Корнберга (при синтезе полимера аденилат-тимидилат), олигонуклеотиды являются ускорителями реакции. Однако для того чтобы олигонуклеотиды выполняли свою функцию, они должны иметь не эстерифицированную конечную С-3 гидроксильную группу. Возможность получения с помощью полинуклеотидфосфорилазы полинуклеотидов, содержащих заранее заданное количество оснований, была широко использована физико-химиками для изучения свойств таких искусственных полирибонуклеотидов. Способность к ассоциации подобных полимеров в двухтяжевые (дезоксирибонуклеиноподобные) и даже трехтяжевые структуры резко увеличила интерес к этим соединениям.

При наличии в реакционной смеси всех четырех нуклеозиддифосфатов полинуклеотидфосфорилаза катализирует синтез полирибонуклеиноподобных полирибонуклеотидов. По строению и свойствам такой полирибонуклеотид по некоторым данным ничем не отличается от РНК. Полинуклеотидфосфорилаза получена из самых разнообразных биологических источников: микробов, растений, тканей высших животных. Точная локализация этого фермента в клетке еще не ясна.

В 1959—1960 гг. обнаружено несколько отличных от полинуклеотидфосфорилазы ферментов, катализирующих синтез РНК. Среди них можно упомянуть фермент, катализирующий присоединение трех нуклеозидтрифосфатов к растворимой РНК. Был выделен фермент из ядер тимуса и описаны реакции образования без затравки кислотонерастворимого полинуклеотида. В куриных эмбрионах найден фермент, включающий АТФ в РНК. В ядрах крысиной печени и в микробах обнаружена новая система, синтезирующая РНК. В этом случае необходимо присутствие всех четырех трифосфатов и затравки ДНК [7, 8, 9, 10]. Каковы взаимоотношения этих ферментов и в чем заключается их роль в жизни клетки, сейчас еще не ясно.

Однако, по-видимому, последняя система представляет наибольший биологический интерес, так как с ее помощью синтезируется недавно открытая так называемая медиаторная или «мессенджер» РНК (М-РНК). Эта РНК получает необходимую информацию от молекулы ДНК, на которой она синтезируется в виде комплементарной спирали и переносит информацию на рибосому к месту синтеза белка.

В настоящее время в цитоплазме найдено по крайней мере 6 различных РНК: две рибосомальных РНК, М-РНК, растворимая, мембранная и митохондриальная рибонуклеиновые кислоты.

По мере того как выясняется роль нуклеиновых кислот, становится все более понятным их значение в основных жизненных процессах. Вполне понятна поэтому важность выяснения механизма синтеза нуклеиновых кислот и его воспроизведение *in vitro*.

УЧАСТИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В СИНТЕЗЕ БЕЛКА

Рассмотрим вопросы влияния нуклеиновых кислот на синтез белка. До сих пор остается неясным, является ли ДНК непосредственным участником акта биосинтеза белка. Выводы из ряда работ, которые как будто говорили в пользу этого мнения, сейчас пересматриваются. Например, данные Мирского о непосредственном участии ДНК в синтезе белка ядрами можно толковать, как пишет сам автор, иначе. Дело в том, что ДНК в этом случае может принимать участие в синтезе белка как донатор АТФ, необходимой для синтеза [11]. К тому же показано, что синтез белка в ядрах осуществляется с помощью рибонуклеопротеидных частиц [12].

Более достоверны предположения об участии РНК в процессах синтеза белков. Многочисленными исследованиями показано, что РНК является необходимым компонентом системы, синтезирующей белок. РНК, кроме того, выполняет ряд других биологических функций, в частности, она переносит генетическую информацию между ядром и цитоплазмой и является индуктором развития и дифференциации.

Если несколько лет тому назад по кординальнейшему вопросу биохимии — синтезу белков — почти ничего нельзя было сказать, то в настоящее время существует солидно подкрепленная экспериментальными фактами гипотеза [13].

Синтезирующая белок система состоит из рибонуклеопротеидных частиц — рибосом, М-РНК, растворимой РНК, рН 5-фракции, АТФ — генерирующей системы, набора аминокислот и ГТФ. Рассмотрим функции важнейших участников этой системы.

На строении и составе рибосом мы подробно останавливались ранее (см. Строение и физико-химические свойства нуклеиновых кислот). Здесь уместно лишь отметить, что хотя рибосомы, имеющие константу седиментации, равную 70—80 единицам Свирдберга, по-видимому, наиболее активно включают аминокислоты, однако далеко не все они обладают этой способностью. Рибосомы, возможно, являются универсальным местом синтеза белка.

Так называемая растворимая РНК обычно находится в центрифугате после удаления всех частиц центрифугированием в течение 2—3 часов при 100 000 g. Если этот центрифугат довести до рН 5, то в осадок выпадает рН 5-фракция, ранее называвшаяся рН 5-ферментом и состоящая из растворимой РНК и растворимых белков, в состав которых входят ферменты, активирующие аминокислоты, катализирующие включение активированных аминокислот, а также концевых нуклеотидов в растворимую РНК и другие белки. Ассоциация растворимой РНК и ферментов в рН 5-фракцию вовсе необязательна; можно получить растворимую РНК отдельно от фер-

ментов рН 5-фракции. После удаления рН 5-фракции остается центрифугат, или растворимая фракция, способная в какой-то степени заменить рН 5-фракцию при синтезе белка. Центрифугаты также содержат ферменты, включающие концевой нуклеотид в растворимую РНК. Эти центрифугаты удается разделить на две фракции — содержащую белок и содержащую РНК, которые порознь неактивны. Из центрифугата получены диализуемый и недиализуемый компоненты, при соединении которых возникает система, катализирующая перенос аминокислот с растворимой РНК к рибосомам. Порознь указанные компоненты неактивны. Необходимо отметить, что диализуемая фракция может быть заменена раствором, содержащим высокие концентрации нуклеозидтрифосфатов, которые, по всей видимости, нужны для генерации ГТФ. Растворимая РНК, полученная из ткани млекопитающих, имеет молекулярный вес порядка 15 000—30 000, а из микробного материала — 30 000—50 000. Состав азотистых оснований растворимых РНК животных и микроорганизмов в противоположность рибосомальной РНК довольно схож. Растворимая РНК отлична от рибосомальной РНК и по другим компонентам, как это видно из табл. 2 и 3, взятых нами из работы Хогланда [14].

Таблица 2
Состав азотистых оснований, растворимой
и рибосомальной РНК

Источник	Аденин	Гуанин	Цитозин	Урацил
Растворимая РНК				
<i>E. coli</i>	10	17,2	15,5	8,1
<i>E. coli</i>	10	16,9	15,4	8,7
<i>E. coli</i>	10	17,4	14,8	8,7
<i>E. coli</i>	10	17,9	13,7	8,9
Дрожжи	10	18,3	15,1	9,5
Печень крысы	10	17,4	15,4	10,2
Печень крысы	10	15,4	9,6	6,7
Печень морской свинки	10	18,3	16,7	11,1
Асцитные клетки у мышей	10	18,2	13,4	9,6
Рибозомальная РНК				
<i>E. coli</i>	10	12,2	8,7	8,0
<i>A. Vinelandii</i>	10	9,6	7,6	9,6
Дрожжи	10	10,1	7,1	8,6
Печень крысы	10	17,5	15,8	10,1
Печень кролика	10	15,9	15,5	10,3
Асцитные клетки у мышей	10	20,6	14,1	10,3

Последовательность расположения нуклеотидов в растворимой РНК неизвестна. Растворимые РНК содержат на конце цитидин-цитидин-аденин-нуклеотиды. Однако неизвестно, к каким нуклеотидам прикреплены эти три нуклеотида в остальной молекуле РНК.

В клетке растворимая РНК выполняет функцию переноса аминокислотных остатков к рибосомальной РНК. По всей вероятности, этим ее назначение не ограничивается. Уже установлено, что некоторые ее фракции спо-

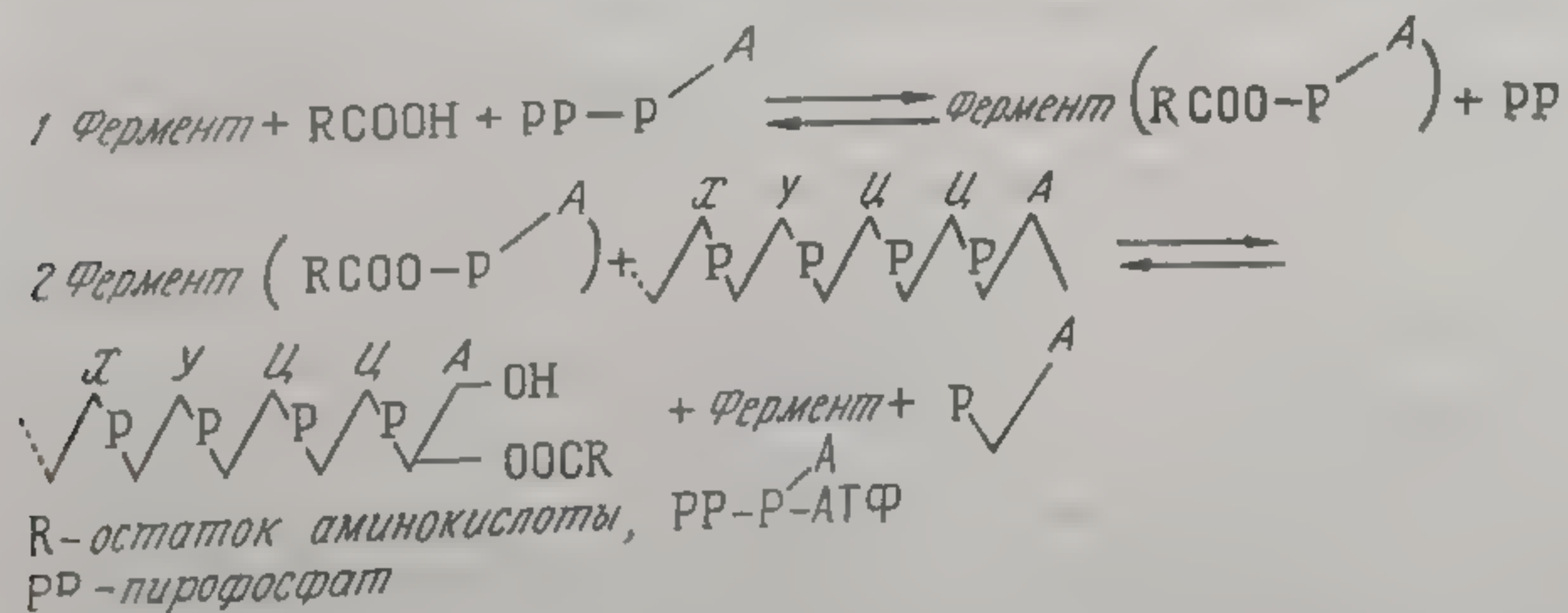
Таблица 3
Сравнительные соотношения добавочных
компонентов в растворимой и микросомной РНК
крысиной печени (в молях на 100 молей уридина)

Компонент	Микро- сомная РНК	Раство- римая РНК
Псевдоуридин	7,5	25
5-метилцитозин	0,4	10
6-метиламинопурин	0,5	8,1
6-диметиламинопурин	0,1	0,1
1-метилгуанин	0,1	3,3
2-метиламин-6-оксипурин	0,1	2,3
2-диметиламино-6-оксипурин	0,1	3,0

собны к переносу и нуклеотидных остатков. Таким образом, две биохимические функции сосредоточены в полинуклеотиде с молекулярным весом порядка 10 000—40 000, содержащем всего 40—130 моновнуклеотидов.

М-РНК имеет молекулярный вес около 500 000 и тот же нуклеотидный состав, что и ДНК, на которой она синтезируется. М-РНК метаболнчески весьма активна; она быстро синтезируется и быстро распадается, при этом продукты ее деградации включаются частично в рибосомальную и частично в растворимую РНК [11].

Биосинтез белков, по-видимому, происходит следующим образом: аминокислоты активируются специальными ферментами, катализирующими образование аденилатов аминокислот. Активированные аминокислоты соединяются с концевой группой растворимой РНК. Это присоединение возможно только в тех случаях, когда концевая часть растворимой РНК состоит из двух цитидиннуклеотидов и одного адениннуклеотида. Подобное присоединение идет по следующей схеме:



Растворимая РНК переносит аминокислоты к РНК рибосомы; на последней расположена М-РНК, которая служит кодированной матрицей для белкового синтеза. Существует специальный фермент, катализирующий перенос аминокислот. Роль ГТФ, хотя он и совершенно необходим для белкового синтеза, до сих пор неясна. На основании этих и других экспериментальных данных Хогландом выдвинута адаптерная гипотеза синтеза белка, согласно которой:

1. Каждая аминокислота включается в олигонуклеотид, специфичный для данной аминокислоты ферментом.
2. Необходимы отдельные ферменты для включения каждой активированной аминокислоты в свою растворимую РНК (свой адаптер).

3. Аминокислота достигает матрицы в сопровождении своего нуклеотидного компонента.

4. Аминокислота не вступает в прямой химический контакт с матрицей. Со специфическим участком на матрице контактирует растворимая РНК, являющаяся комплементарной к данному участку рибосомальных РНК или к М-РНК.

5. Растворимая РНК и ферменты, катализирующие включение аминокислот, не имеют видовой специфичности.

6. Соединение адаптера с рибосомой является обратимым.

Сам автор указывает на неясные места в его гипотезе. Непонятно, почему относительно большие молекулы растворимой РНК используются для переноса только одной аминокислоты. Растворимая РНК является небольшой молекулой по сравнению с содержащей код РНК рибосом. Считая, что молекулярный вес растворимой РНК равен 30 000, а рибосомной — 1 500 000, нетрудно заметить, что на рибосомной РНК может разместиться не более 50 молекул растворимой РНК, а значит и 50 аминокислот, что явно недостаточно для образования молекулы белка. Для разрешения этого несоответствия был выдвинут ряд предположений, согласно которым только какая-то часть растворимой РНК располагается на рибосоме и т. д. Однако до сих пор все они не подкреплены никакими фактами. И, наконец, адаптерная гипотеза не объясняет механизм конденсации аминокислот в рибосомах. Непонятно, как происходит взаимодействие растворимой РНК с рибосомной, как обеспечивается контакт между аминокислотами и какова роль белковой компоненты рибосом, наличие которой необходимо для синтеза.

С открытием М-РНК, участвующей в синтезе белка, все эти вопросы стали еще более запутанными и неясными. На какую часть рибосомы «садится» эта М-РНК и каково ее взаимодействие с растворимой и рибосомальной РНК, неизвестно.

В последнее время установлены новые факты, свидетельствующие о том, что либо эта гипотеза не во всем правильная, либо существуют еще другие механизмы синтеза белков [12]. Так, рядом экспериментов доказано, что включение аминокислот в рибосомы может происходить в отсутствии рН 5-фракции или даже клеточного сока. На этом основании можно заключить, что предварительная активация аминокислот и образование аденилатов вовсе не являются необходимым промежуточным этапом синтеза белков.

Удалось также выделить фермент, катализирующий включение аминокислот и заменяющий рН 5-фракцию. Установлено, что образование промежуточного соединения — растворимая РНК — аминокислота — не во всех случаях необходимо для включения аминокислот в белок.

Из протопластов удалось выделить систему, состоящую из рибосом и растворимой фракции, названной полимеразой аминокислот, которая катализировала включение аминокислот. Далее оказалось, что рибосомы, выделенные из ядер, отличны от цитоплазматических; они требуют для своей метаболической активности ионов Na, а не K и, по-видимому, устойчивы к действию рибонуклеазы [13].

На основании этих и ряда других фактов в настоящее время мнение большинства исследователей склоняется в пользу признания возможности существования различных путей биосинтеза белков. Высказываются предположения, что структурные белки рибосом синтезируются с помощью механизма, отличного от механизма синтеза растворимых белков. По-видимому, универсальным и обязательным компонентом систем, синтезирующих белки, являются только рибосомы и М-РНК, но это пока еще более или менее обоснованное предположение.

Недавно Пардю, Жакоб и Моно [15] на основании изучения кинетики синтеза белков поставили под сомнение и вывод об обязательном участии стабильной РНК рибосом в белковом синтезе. Участок хромосомы из штамма клеток, способных синтезировать β -галактозидазу, они вносили в цитоплазму клеток, не способных к этому синтезу. Немедленно после операции эти клетки начинали синтезировать β -галактозидазу, причем синтез продолжался до тех пор, пока в цитоплазме находился участок хромосомы. Это можно объяснить следующим образом: 1) ДНК является матрицей, на которой синтезируется белок; 2) некоторые рибонуклеиновые частицы прижаты матрицей для синтеза фермента, но только до тех пор, пока целостность участка хромосом не нарушена; 3) в цитоплазме образуются новые матрицы РНК, передающие информацию, но они нестабильны, так как исчезают при исчезновении хромосомы.

Легко заметить, что последние два предположения вполне основательны после обнаружения лабильной М-РНК. Можно было бы привести еще много фактов, свидетельствующих о том, что вопросы участия нуклеиновых кислот в синтезе белков еще далеко не ясны.

В заключение следует остановиться на некоторых интересных данных, касающихся места синтеза белков. Так, удалось установить, что сывороточный альбумин и гемоглобин синтезируются в микросомах, причем синтезируемые белки секретируются в цитоплазму [16]. Заслуживает внимания наблюдение, что при инкубации рибосом ретикулоцитов кролика с рН-5-фракцией, полученной из ретикулоцитов морской свинки, синтезировались оба гемоглобина [17]. В опытах с рН 5-фракцией из печени свиньи синтез гемоглобина не происходил, но удавалось наблюдать включение меченого лейцина в неидентифицированный растворимый белок [18].

Из огромной массы экспериментальных данных мы попытались выбрать наиболее важные и проверенные факты и изложить их в более или менее систематизированном виде. Само собой разумеется, что приведенных в данной главе материалов еще недостаточно для решения основного вопроса современной биохимии — проблемы биосинтеза белков, но мы надеемся, что недалеко то время, когда эта проблема будет разрешена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kornberg A. Science, 1960, 131, 1503.
2. Bollum F. J. J. Biol. Chem., 1959, 234, 2733.
3. Bollum F. J. J. Biol. Chem., 1960, 235, 2399.
4. Bollum F. J. J. Biol. Chem., 1960, 235, XXVI.
5. Schachman H. K., Adler J., Radding C. M., Sehman J. R. a. Kornberg J. Biol. Chem., 1960, 235, 3242.
6. Богоявленская Н. В., Тонгур В. С. Успехи современной биологии, 1952, 48, 19.
7. Weiss S. B. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1960, 46, 1020.
8. Chung C. W., Mahler H. R., Enriome M. J. Biol. Chem., 1960, 235, 1448.
9. Moldave K. Biochim. biophys. acta, 1960, 43, 188.
10. Edmonds M. a. Abrams R. J. Biol. Chem., 1960, 235, 1142.
11. Гро Ф. и др. Симпозиум V Международного биохимического конгресса, 1961.
12. Тонгур и др. Успехи соврем. биологии, 1960, 49, 156.
13. Frenster J. H., Alfrey V. G. a. Mirsky A. E. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1960, 46, 432.
14. Hoagland M. The Nucleic Acids, 1960, v. 3, 349.
15. Cohen G. N. a. Gross F. Annual. Rev. Biochemistry, 1960, 29, 525.
16. Campbell T. N., Greengard O., Kernot B. A. Biochem. J., 1960, 107, 1960.
17. Kruh I., Jean-Claude Dreyfus a. Schapira G. Bioch. biophys. acta, 1961, 49, 509.
18. Kruh J., Jean-Claude Dreyfus a. Schapira G. J. Biol. Chem., 1960, 235, 1075.

ГЛАВА IV

ХИМИЯ ВИРУСОВ

Т. И. Тихоненко

Первый химический анализ вирусов (и первое выделение вирусов в большом количестве, достаточном для химического анализа) был выполнен в 1933 г. в Германии Шлезингером, показавшим, что бактериофаг *Escherichia coli* состоит главным образом из белка и дезоксирибонуклеиновой кислоты; последняя была идентифицирована Шлезингером с помощью реакции Фельгена [1, 2].

Следующим крупным успехом в области химического исследования вирусов была кристаллизация вируса табачной мозаики (ВТМ), осуществленная в 1935 г. Стенли (США) [3]. Кристаллизация ВТМ дала, с одной стороны, надежный критерий чистоты и гомогенности вирусных препаратов, а с другой — великоленную модель для исследования, так как из 1 л сока зараженных растений можно выделить около 1 г очищенного вируса при сравнительной простоте методов очистки. В последующие годы были опубликованы работы Боудена и Пири (Англия) по анализу ряда растительных вирусов, заложившие основы наших современных знаний по химическому составу вирусов вообще. Этими авторами было, в частности, показано, что кристаллический ВТМ является не глобулином, как считал вначале Стенли, а нуклеопротеидом, содержащим нуклеиновую кислоту «дрожжевого типа», т. е. рибонуклеиновую кислоту (РНК). Боуден и Пири получили также в кристаллическом виде ряд других растительных вирусов и показали, что все они являются нуклеопротеидами, состоящими из белка и РНК [4]. Данные Стенли и Боудена [3—5] были вскоре подтверждены работами многих исследователей, в том числе В. Л. Рыжкова, предложившего новый метод очистки вируса табачной мозаики [6].

Все до сих пор выделенные и исследованные вирусы являются нуклеопротеидами, в состав которых входят белки и нуклеиновые кислоты: либо РНК, либо ДНК, либо обе вместе. Вопрос о наличии в составе вирусных частиц других химических компонентов — липидов, углеводов, металлов и некоторых метаболитов — оказался значительно сложнее, хотя в ряде случаев доказано, что вирусы действительно содержат, кроме белков и нуклеиновых кислот, ряд других соединений.

Как видно из табл. 1, элементарный состав вирусов не отличается от состава обычных растительных, животных и бактериальных белков, приведенных в таблице для сравнения. Элементарный химический состав вирусов растений практически тождествен с простыми белковыми веществами, за исключением фосфора и углеводов, обусловленных присутствием в вирусной частице нуклеиновой кислоты. Элементарный состав вирусов животных

Таблица 1

Элементарный состав некоторых вирусов

Наименование вируса	C	H	N	P	S	Угле- воды	Зола
Х-вирус картофеля	48,6	7,4	16,3	0,45	—	2,3	2,7
Вирус табачной мозаики	49,6	7,3	16,5	0,50	0,41	2,5	2,2
» огуречной мозаики	50,5	7,3	15,5	0,58	0,30	2,4	1,5
» карликовой кустистости тома- тов	47,0	7,3	16,0	1,30	—	6,0	—
Вирус южной мозаики фасоли	45,6	6,5	17,0	1,89	1,34	—	5,7
» кольцевой пятнистости табака	50,6	7,6	14,6	3,60	0,39	16,6	—
Состав растительных белков по Бла- говещенскому	49,9— 53,2	6,6— 7,4	15,8— 19,0	—	0,32— 2,26	—	—
Вирус энцефаломиеелита лошадей	62,2	—	7,7	2,2	—	4,0	—
» гриппа свиней	51,4	—	9,0	0,87	—	10,0	—
» гриппа А	53,2	—	10,0	0,97	—	12,5	—
» папилломы	49,6	7,2	15,0	0,94	2,2	6,5	2,5
» осповакцины	33,7	—	15,3	0,57	—	2,8	0,7
» саркомы Рауса	—	—	12,4 13,5	0,8 1,2	—	4,5 15,7	1,7 6,1
Вирус желтухи тутового шелкопряда (полиэдры)	54,3	7,0	14,2	0,31	1,50	—	1,52
Бактериофаг кишечной палочки	42,3	—	13,9	5,22	—	11,7	—
Нормальный компонент куриного эмб- риона	55,3	—	9,5	2,30	—	7,0	—
Состав микробов по Кузину	48,9— 51,3	—	6,3— 13,8	1,3— 3,7	—	—	10,0

Примечание. Прочерки (—) означают, что анализы не производились.

и человека, как правило, несколько сложнее в связи с присутствием наряду с нуклеиновой кислотой и белком некоторых других компонентов. Общий химический состав ряда вирусов животных и человека представлен в табл. 2.

Таблица 2

Общий химический состав некоторых вирусов

Наименование вирусов	Белки	Нуклеиновые кислоты		Углеводы	Липоиды
		РНК	ДНК		
Вирус осповакцины	89,0	0,0	5,6	2,8	5,7
» папилломы	90,0	0,0	6,8	6,5	1,5
» энцефаломиеелита	49,1	4,4	0,0	4,0	54,1
» гриппа А	65,0	1,0	0,0	12,5	23,4
» гриппа свиней	67,6	—	+	10,0	24,0
» болезней Ньюкестля	61,8	3,5	0,61	7,0	27,0
» саркомы Рауса	—	10	0,0	4,5—15,7	39—57
» миксомы кроликов	58,7	0,0	1,1	—	30
» желтухи шелкопряда	85	0	15	—	—
Бактериофаг кишечной палочки	52,4	0,0	44—50	11,7	+

Примечание. Принятые в таблице обозначения: (—) — нет данных; (0) — отсутствуют, (+) — содержится, но количество неизвестно.

Следует отметить, что наши знания о химическом составе вирусов неполны, так как химическому анализу подвергались лишь сравнительно хо-

Аминокислотный состав

Аминокислоты	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	в г аминокислотных								
Аланин	4,1	4,9	6,0	3,5	2,0	2,1	—	2,5	4,6
Аргинин	8,8	8,3	5,7	2,3	4,5	3,6	3,5	6,2	8,6
Аспарагиновая кислота + аспарагин	11,7	11,3	8,9	5,3	6,4	6,4	5,4	9,5	7,3
Цистеин	0,6	0,0	0,6	1	—	—	—	—	—
Цистин	0,0	0,0	—	—	—	—	—	5,4	0,8
Глютаминовая кислота + глютамин	9,9	5,7	4,4	5,4	6,8	5,5	5,4	10,2	7,6
Глицин	1,4	1,1	3,7	4,3	1,9	2,2	1,4	2,4	4,4
Гистидин	0,0	0,0	1,1	0,4	1,2	1,3	0,7	1,7	1,5
Изолейцин	5,7	4,0	5,8	3,0	3,5	3,6	2,8	3,7	6,1
Лейцин	8,0	8,1	9,2	2,7	4,6	4,7	3,7	6,3	8,2
Лизин	1,3	2,1	3,7	2,9	3,2	4,1	2,2	6,2	3,4
Метионин	0,0	0,0	1,8	1,0	2,0	1,9	1,0	1,9	3,0
Фенилаланин	7,5	8,7	4,2	2,5	3,3	3,0	3,2	4,1	4,6
Пролин	4,9	4,8	2,4	1,8	2,2	2,3	2,4	4,6	3,6
Серин	6,9	7,8	5,1	2,4	1,8	1,8	1,7	3,3	6,7
Треонин	8,4	5,9	8,1	2,7	3,1	3,4	3,2	4,4	10,2
Триптофан	1,9	0,5	0,5	—	1,0	0,6	0,6	0,9	—
Тирозин	3,4	3,3	4,1	2,9	2,8	1,9	2,0	5,3	5,9
Валин	7,8	7,5	10,3	2,7	2,9	2,7	2,7	4,6	5,8

Примечания. 1. Прочерки означают, что соответствующие определения не про-
мозаики; 3 — вирус кустистой мозаики табака; 4 — T2 фаг *Escherichia coli*; 5 — вирус
лантоисной жидкости; 8 — вирус папилломы Шопа; 9 — вирус южной мозаики фасоли;
Escherichia coli; 13 — вирус кустистой карликовости томата (BS3 — штамм); 14 — по-
кий вирус *Malocosome americanum*; 17 — полиэдрический вирус *Ma'ocosome distria*;
eurytheme; 20 — капсульный вирус *Coccocia murinana*; 21 — капсульный вирус

рошо очищенные препараты немногих вирусов, поражающих в основном рас-
тения и бактерии. Это обстоятельство обязывает нас к большой осторожно-
сти в построении общих схем и гипотез относительно структуры и состава
вирусных частиц, с одной стороны, и в то же время предостерегает от излиш-
ней недоверчивости к экспериментальным данным, противоречащим нашим
представлениям, с другой. Следует помнить, что наши представления о ви-
русных частицах на 90%, если не больше, основаны на аналогиях и сравне-
ниях с немногими изученными видами вирусов.

1. БЕЛКИ ВИРУСОВ

а) Аминокислотный состав белков

Белки всех исследованных до настоящего времени вирусов состоят
из обычных аминокислот, принадлежащих к естественному L-ряду. D-ами-
нокислот в составе вирусных частиц не найдено. Как видно из табл. 3, соот-
ношения аминокислот в вирусных белках достаточно близки к таковым в
белках животных, бактерий и растений, так что и в этом отношении вирусы
не представляют какого-либо исключения (для сравнения в табл. 3 приведен
аминокислотный состав нормальных частиц аллантоисной жидкости [7] и
белков кишечной палочки [12]).

Несмотря на столь «тривиальный» характер аминокислотного набора,
вирусы отличаются рядом особенностей, в частности устойчивостью к про-
теолитическим ферментам [7, 8, 9]. Такая уникальная устойчивость не связа-

10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
остатков на 100 г вируса											
9,9	9,4	8,4	4,7	5,9	4,4	3,9	3,6	4,5	3,5	4,6	5,0
8,46	6,5	8,2	5,7	19,8	2,8	16,1	15,5	11,1	19,5	16,4	16,3
10,07	12,0	9,6	9,2	12,0	5,4	11,0	11,0	13,3	13,2	14,0	13,2
—	—	—	0,6	—	—	—	—	—	—	—	—
0,83	—	—	—	0,9	—	0,8	0,6	0,7	1,1	0,6	0,6
11,21	12,0	9,6	5,0	8,5	5,3	9,3	10,0	6,9	7,6	7,0	6,9
2,84	7,3	7,9	4,0	6,1	3,8	4,0	4,9	8,1	3,5	4,6	5,0
Следы	2,6	3,3	1,2	0,9	0,8	1,5	1,1	0,7	1,2	1,9	1,6
—	3,9	4,6	2,7	—	—	—	—	—	—	—	—
6,15	6,5	8,6	8,9	11,0	2,2	11,8	12,7	11,2	11,4	13,0	11,7
7,89	8,5	8,3	3,1	2,1	2,8	3,5	3,5	3,3	2,2	3,4	3,1
2,12	1,3	2,9	0,7	1,0	0,9	2,4	2,4	2,8	1,8	2,8	2,4
6,58	4,2	4,8	3,7	4,5	1,6	4,7	5,5	4,6	4,2	5,6	5,4
3,90	5,0	3,0	2,8	6,4	2,1	6,3	5,2	4,9	4,5	5,3	7,6
3,69	4,8	4,9	5,6	9,4	1,9	10,5	9,0	8,5	9,2	9,8	9,0
14,77	7,0	5,3	8,1	4,4	3,2	6,0	6,4	9,6	6,7	3,8	5,2
2,66	—	1,3	0,6	—	—	—	—	—	—	—	—
1,78	3,7	4,3	3,1	2,8	2,4	4,8	6,1	6,2	6,3	5,0	4,7
4,09	6,5	5,0	7,3	4,4	3,0	3,6	3,1	3,6	3,7	3,6	3,9

изводились. 2. Обозначения граф: 1 — вирус табачной мозаики; 2 — вирус огуречной гриппа, штамм PR-8; 6 — вирус гриппа штамма-Lee; 7 — нормальные частицы ал-10 — X-вирус картофеля; 11 — T4 фаг *Escherichia coli*; 12 — нормальные клетки лиэдрический вирус *Perthetria dispar*; 15 — T3-фаг *Escherichia coli*; 16 — полиэдрический 18 — полиэдрический вирус *Bombix mori*; 19 — полиэдрический вирус *Colias philodice choristoneura fumiferana*.

на с индивидуальными особенностями вирусного белка как такового, ибо при частичном повреждении или легкой денатурации вирусного корпускула, равно как и при выделении белка, последний легко переваривается протеазами. Поскольку устойчивость вирусных частиц к действию протеолитических ферментов нельзя объяснить какими-либо аномалиями в аминокислотном составе или наличием в белке связей особого типа, остается предположить, что она обусловлена структурными особенностями корпускула в целом. Такое объяснение, разумеется, имеет весьма общий характер, но более детальными сведениями на этот счет мы пока не располагаем.

По данным Росса [10] и Найта [11], количество амидного азота у ВТМ составляет 1,35—1,5%. Однако это количество амидного азота может нейтрализовать лишь часть ω -карбоксильных групп дикарбоновых кислот. На основании молекулярного веса ВТМ (50 млн.) и данных табл. 3 можно подсчитать, что, например, белок ВТМ содержит кислых групп на 8000 больше, чем основных. В этом расчете не приняты во внимание потенциально кислые группы тирозина и цистеина и связи основных аминокислот с фосфатными группами нуклеиновой кислоты, так что в действительности свободных кислых группировок в белке еще больше.

Аминокислотный состав белкового компонента характерен не только для данного вирусного вида, но и для входящих в этот вид мутантов и штаммов. Многочисленные данные Найта по характеристике аминокислотного состава белков штаммов ВТМ сведены в табл. 4, где приводятся также данные других исследователей по аминокислотному составу штаммов вируса гриппа и карликовой кустистости томатов.

Аминокислотный состав

Аминокислоты	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	в г аминокислотных								
Аланин	4,1	4,9	6,0	3,5	2,0	2,1	—	2,5	4,6
Аргинин	8,8	8,3	5,7	2,3	4,5	3,6	3,5	6,2	8,6
Аспарагиновая кислота + аспарагин	11,7	11,3	8,9	5,3	6,4	6,4	5,4	9,5	7,3
Цистеин	0,6	0,0	0,6	1	—	—	—	—	—
Цистин	0,0	0,0	—	—	—	—	—	—	—
Глютаминовая кислота + глютамин	9,9	5,7	4,4	5,4	6,8	5,5	5,4	10,2	7,6
Глицин	1,4	1,1	3,7	4,3	1,9	2,2	1,4	2,4	4,4
Гистидин	0,0	0,0	1,1	0,4	1,2	1,3	0,7	1,7	1,5
Изолейцин	5,7	4,0	5,8	3,0	3,5	3,6	2,8	3,7	6,1
Лейцин	8,0	8,1	9,2	2,7	4,6	4,7	3,7	6,3	8,2
Лизин	1,3	2,1	3,7	2,9	3,2	4,1	2,2	6,2	3,4
Метионин	0,0	0,0	1,8	1,0	2,0	1,9	1,0	1,9	3,0
Фенилаланин	7,5	8,7	4,2	2,5	3,3	3,0	3,2	4,1	4,6
Пролин	4,9	4,8	2,4	1,8	2,2	2,3	2,4	4,6	3,6
Серин	6,9	7,8	5,1	2,4	1,8	1,8	1,7	3,3	6,7
Треонин	8,4	5,9	8,1	2,7	3,1	3,4	3,2	4,4	10,2
Триптофан	1,9	0,5	0,5	—	1,0	0,6	0,6	0,9	—
Тирозин	3,4	3,3	4,1	2,9	2,8	1,9	2,0	5,3	5,9
Валин	7,8	7,5	10,3	2,7	2,9	2,7	2,7	4,6	5,8

белков некоторых вирусов

	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	остатков на 100 г вируса											
9,9	9,4	8,4	4,7	5,9	4,4	3,9	3,6	4,5	3,5	4,6	5,0	
8,46	6,5	8,2	5,7	19,8	2,8	16,1	15,5	11,1	19,5	16,4	16,3	
10,07	12,0	9,6	9,2	12,0	5,4	11,0	11,0	13,3	13,2	14,0	13,2	
—	—	—	0,6	—	1	—	—	—	—	—	—	
0,83	—	—	—	0,9	—	0,8	0,6	0,7	1,1	0,6	0,6	
11,21	12,0	9,6	5,0	8,5	5,3	9,3	10,0	6,9	7,6	7,0	6,9	
2,84	7,3	7,9	4,0	6,1	3,8	4,0	4,9	8,1	3,5	4,6	5,0	
Следы	2,6	3,3	1,2	0,9	0,8	1,5	1,1	0,7	1,2	1,9	1,6	
—	3,9	4,6	2,7	11,0	4,4	11,8	12,7	11,2	11,4	13,0	11,7	
6,15	6,5	8,6	8,9	—	2,2	—	—	—	—	—	—	
7,89	8,5	8,3	3,1	2,1	2,8	3,5	3,5	3,3	2,2	3,4	3,1	
2,12	1,3	2,9	0,7	1,0	0,9	2,4	2,4	2,8	1,8	2,8	2,4	
6,58	4,2	4,8	3,7	4,5	1,6	4,7	5,5	4,6	4,2	5,6	5,4	
3,90	5,0	3,0	2,8	6,4	2,1	6,3	5,2	4,9	4,5	5,3	7,6	
3,69	4,8	4,9	5,6	9,4	1,9	10,5	9,0	8,5	9,2	9,8	9,0	
14,77	7,0	5,3	8,1	4,4	3,2	6,0	6,4	9,6	6,7	3,8	5,2	
2,66	—	1,3	0,6	—	—	—	—	—	—	—	—	
1,78	3,7	4,3	3,1	2,8	2,4	4,8	6,1	6,2	6,3	5,0	4,7	
4,09	6,5	5,0	7,3	4,4	3,0	3,6	3,1	3,6	3,7	3,6	3,9	

изводились. 2. Обозначения граф: 1 — вирус табачной мозаики; 2 — вирус огуречной мозаики; 3 — вирус кустистой мозаики табака; 4 — T2 фаз Escherichia coli; 5 — вирус лантоисной жидкости; 6 — вирус папилломы Шопа; 7 — нормальные частицы ал- гриппа, штамм PR-8; 8 — вирус гриппа штамма-Lee; 9 — нормальные клетки Escherichia coli; 10 — X-вирус картофеля; 11 — T4 фаз Escherichia coli; 12 — нормальные клетки лиэдрического вируса Parthetria dispar; 13 — T3-фаз Escherichia coli; 14 — полиэдрический вирус Bombyx mori; 15 — полиэдрический вирус Colias philodice; 16 — полиэдрический вирус Bombyx mori; 17 — полиэдрический вирус Colias philodice; 18 — полиэдрический вирус Bombyx mori; 19 — полиэдрический вирус Colias philodice; 20 — капсульный вирус Coccovirus turinana; 21 — капсульный вирус chorisoneura fumiferana.

на с индивидуальными особенностями вирусного белка как такового, ибо при частичном повреждении или легкой денатурации вирусного корпускула, равно как и при выделении белка, последний легко переваривается протеазами. Поскольку устойчивость вирусных частиц к действию протеолитических ферментов нельзя объяснить какими-либо аномалиями в аминокислотном составе или наличием в белке связей особого типа, остается предположить, что она обусловлена структурными особенностями корпускула в целом. Такое объяснение, разумеется, имеет весьма общий характер, но более детальными сведениями на этот счет мы пока не располагаем.

По данным Росса [10] и Найта [11], количество амидного азота у ВТМ составляет 1,35—1,5%. Однако это количество амидного азота может нейтрализовать лишь часть ω -карбоксильных групп дикарбоновых кислот. На основании молекулярного веса ВТМ (50 млн.) и данных табл. 3 можно предположить, что, например, белок ВТМ содержит кислых групп на 8000 больше, чем основных. В этом расчете не приняты во внимание потенциально кислые группы тирозина и цистеина и связи основных аминокислот с фосфатными группами нуклеиновой кислоты, так что в действительности свободных кислых группировок в белке еще больше.

Аминокислотный состав белкового компонента характерен не только для одного вирусного вида, но и для входящих в этот вид мутантов и штаммов.

Примечания. 1. Прочерки означают, что соответствующие определения не проведены. 2. Обозначения граф: 1 — вирус табачной мозаики; 2 — вирус огуречной мозаики; 3 — вирус кустистой мозаики табака; 4 — T2 фаз Escherichia coli; 5 — вирус лантоисной жидкости; 6 — вирус папилломы Шопа; 7 — нормальные частицы ал- гриппа, штамм PR-8; 8 — вирус гриппа штамма-Lee; 9 — нормальные клетки Escherichia coli; 10 — X-вирус картофеля; 11 — T4 фаз Escherichia coli; 12 — нормальные клетки лиэдрического вируса Parthetria dispar; 13 — T3-фаз Escherichia coli; 14 — полиэдрический вирус Bombyx mori; 15 — полиэдрический вирус Colias philodice; 16 — полиэдрический вирус Bombyx mori; 17 — полиэдрический вирус Colias philodice; 18 — полиэдрический вирус Bombyx mori; 19 — полиэдрический вирус Colias philodice; 20 — капсульный вирус Coccovirus turinana; 21 — капсульный вирус chorisoneura fumiferana.

рошо очищенные препараты немногих вирусов, поражающих в основном растения и бактерии. Это обстоятельство обязывает нас к большой осторожности в построении общих схем и гипотез относительно структуры и состава вирусных частиц, с одной стороны, и в то же время предостерегает от излишней недоверчивости к экспериментальным данным, противоречащим нашим представлениям, с другой. Следует помнить, что наши представления о вирусных частицах на 90%, если не больше, основаны на аналогиях и сравнениях с немногими изученными видами вирусов.

1. БЕЛКИ ВИРУСОВ

а) Аминокислотный состав белков

Белки всех исследованных до настоящего времени вирусов состоят из обычных аминокислот, принадлежащих к естественному L-ряду. D-аминокислот в составе вирусных частиц не найдено. Как видно из табл. 3, соотношения аминокислот в вирусных белках достаточно близки к таковым в белках животных, бактерий и растений, так что и в этом отношении вирусы не представляют какого-либо исключения (для сравнения в табл. 3 приведен аминокислотный состав нормальных частиц аллантоисной жидкости и белков кишечных бактерий).

	Вirus табач							
	дикий тип		M	j-14-D1	9A	YA	HR	B2
	+	++						
Аланин	4,1	5,9	—	—	—	—	5,1	—
Аргинин	8,8	8,7	—	—	10,0	10,0	—	—
Аспарагиновая кислота	11,7	10,4	—	—	—	—	10,9	12,3
Цистеин	0,6	0,6	—	—	—	—	—	—
Глютаминовая кислота	9,9	9,7	—	9,1	—	—	13,6	—
Глицин	1,4	1,9	—	—	—	—	1,0	—
Гистидин	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0
Изолейцин	5,7	5,1	—	—	4,9	4,9	55,1	—
Лейцин	8,0	6,9	—	—	—	—	—	—
Лизин	1,3	1,2	—	1,7	—	—	—	—
Метионин	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0
Фенилаланин	7,5	7,3	—	—	—	—	4,8	—
Пролин	4,9	4,6	—	—	—	—	4,7	8,8
Серин	6,0	7,6	—	—	—	—	7,0	8,4
Треонин	8,4	10,1	—	—	—	—	1,3	—
Триптофан	1,9	1,7	—	—	—	—	1,3	—
Тирозин	3,4	3,3	—	—	—	—	6,1	—
Валин	7,8	9,3	—	—	—	—	5,3	—

Примечание. В первой колонке (+) в графе штаммы вируса табачной мозаики для сравнения с последующими колонками до S-3-штамма включительно. Расхождение кислот в штаммах вируса табачной мозаики определялось микробиологически с 5-летним

Различия в содержании аминокислот между отдельными штаммами (табл. 4), превышающие 10% от их абсолютной величины, являются статистически достоверными. Обычно различия в аминокислотном составе мутантов выражаются в количественном содержании той или иной аминокислоты, но иногда, как, например, у штамма HR BTM, обнаруживаются и качественные различия: гистидин и метионин, содержащиеся в белке штамма HR, полностью отсутствуют в белках других штаммов BTM. Размах вариативности в содержании тех или иных аминокислот у мутантов, как правило, достаточно широк: различия обнаруживаются не по какой-либо одной или немногим аминокислотам, а практически по большинству представленных в белке аминокислот. Так, из 13 исследованных штаммов BTM статистически достоверные различия обнаружены в отношении 15 из 18 аминокислот.

Интересное исследование в этом направлении проведено Ахом [12], проанализировавшим аминокислотный состав белка дикого штамма BTM *vulgaris* и трех его последовательно полученных мутантов: *flavum* → *pesans* → *revirescens*, а также дикого штамма *dahlemense* и полученного из него мутанта *luridum*. Между аминокислотным составом диких штаммов обнаружены значительные различия по 8 аминокислотам; различия между мутантами одной линии носили хотя и менее выраженный, но статистически достоверный характер. На основании обнаруженных автором различий в аминокислотном составе белка мутантов можно сделать вывод, что при молекулярном весе пептидной цепочки BTM около 18/270 и вхождении в нее 164 остатков аминокислот мутация *vulgaris* → *flavum* сопровождается заменой в пептидной цепочке одного остатка валина и одного остатка аланина двумя остатками аспарагиновой кислоты; мутации *flavum* → *pesans* соответствует замена одного остатка аланина фенилаланином; мутация *pesans* → *revirescens*

ной мозаики						Вирус гриппа		Вирус кустистой карликовости томатов		
B2A	B-3	B-4	S-1	S-2	S-3	PR-8	Lee	BS-3	BS-9	BS-10
7,8	7,8	—	4,7	4,5	5,3	2,0	2,1	4,7	4,9	4,8
9,9	—	—	—	—	—	4,5	3,6	5,7	5,9	5,7
—	—	12,7	—	—	—	6,4	6,4	9,2	9,5	9,2
—	—	—	—	—	—	—	—	0,6	0,6	0,6
—	—	—	—	—	—	6,8	6,5	5,0	5,1	4,9
2,5	—	—	—	—	—	1,9	2,2	4,0	4,2	4,1
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	1,3	1,2	1,3	1,2
—	—	—	6,3	6,0	6,2	3,5	3,6	2,7	3,0	2,7
—	—	—	—	—	—	4,6	4,7	8,9	9,1	8,9
1,9	—	—	—	—	—	3,2	4,1	3,1	3,1	3,1
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	1,9	0,7	0,9	1,0
—	—	—	6,1	5,9	6,1	3,3	3,0	3,7	3,9	3,7
8,8	9,1	—	—	8,7	9,0	2,2	2,3	2,8	2,7	2,7
11,0	12,1	—	—	—	—	1,8	1,8	5,6	5,3	5,5
—	—	—	—	—	—	3,4	3,2	8,1	8,2	8,0
—	—	—	—	—	—	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
—	—	—	—	—	—	1,9	2,0	3,1	3,4	3,3
9,9	10,3	10,8	—	—	—	2,7	2,7	7,3	7,0	7,2

для сравнения с колонкой до HR штамма включительно; во второй колонке (++) — между первой (+) и второй (++) колонкой вызваны тем, что содержание аминокислот интервалом между определениями.

сопровождается потерей одного остатка валина, заменяемого одним остатком аспарагина; мутация *dahlemense* → *luridum* обуславливает замену одного остатка глютаминовой кислоты одним остатком лейцина.

В то же время аминокислотный состав некоторых штаммов оказывается практически идентичным, как, например, в случае классического и маскированного (М) штаммов ВТМ, хотя биологические свойства этих штаммов значительно различаются. Точно так же не удалось до сих пор установить отличий в аминокислотном составе белков некоторых штаммов вируса кустистой карликовости томатов [13]. Сравнивая аминокислотный состав суммарного белка и пептидов триптического гидролизата нормального штамма ВТМ и полученного из него при обработке азотистой кислотой мутанта Ni54, Витман [14] пришел к выводу об отсутствии между ними различий в аминокислотном составе и последовательности аминокислот в пределах, устанавливаемых с помощью триптического гидролиза. Возможно, что различия в белке этих штаммов связаны либо со степенью амидирования, либо с последовательностью аминокислот непосредственно в пептидах, либо с последовательностью аминокислот при триптическом гидролизе. Поэтому, резюмируя имеющиеся в нашем распоряжении данные по аминокислотному набору белков у различных штаммов вирусов, можно сделать только осторожный вывод, что белковые компоненты у разных штаммов часто бывают разными.

б) Белковые субъединицы

Интенсивное изучение структуры белковых субъединиц проведено на штаммах ВТМ. С-концевой аминокислотой у всех 13 штаммов ВТМ, отщепляющейся при обработке вирусных частиц карбоксипептидазой, оказался во всех случаях треонин [15]. По данным Гарриса [16, 17] и Найта [11], карбо-

Аминокислотный состав белков

	Вирус табач							
	дикий тип		М	j-14-D1	9A	YA	HR	B2
	+	++						
Аланин	4,1	5,9	—	—	—	—	5,1	—
Аргинин	8,8	8,7	—	—	10,0	10,0	—	—
Аспарагиновая кислота	11,7	10,4	—	—	—	—	10,9	12,3
Цистеин	0,6	0,6	—	—	—	—	—	—
Глутаминовая кислота	9,9	9,7	—	9,1	—	—	13,6	—
Глицин	1,4	1,9	—	—	—	—	1,0	—
Гистидин	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0
Изолейцин	5,7	5,1	—	—	4,9	4,9	55,1	—
Лейцин	8,0	6,9	—	—	—	—	—	—
Лизин	1,3	1,2	—	1,7	—	—	—	—
Метионин	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0
Фенилаланин	7,5	7,3	—	—	—	—	4,8	—
Пролин	4,9	4,6	—	—	—	—	4,7	8,8
Серин	6,0	7,6	—	—	—	—	7,0	8,4
Треонин	8,4	10,1	—	—	—	—	1,3	—
Триптофан	1,9	1,7	—	—	—	—	1,3	—
Тирозин	3,4	3,3	—	—	—	—	6,1	—
Валин	7,8	9,3	—	—	—	—	5,3	—

Примечание. В первой колонке (+) в графе штаммы вируса табачной мозаики для сравнения с последующими колонками до S-3-штамма включительно. Расхождение кислот в штаммах вируса табачной мозаики определялось микробиологически с 5-летним

Различия в содержании аминокислот между отдельными штаммами (табл. 4), превышающие 10% от их абсолютной величины, являются статистически достоверными. Обычно различия в аминокислотном составе мутантов выражаются в количественном содержании той или иной аминокислоты, но иногда, как, например, у штамма HR BTM, обнаруживаются и качественные различия: гистидин и метионин, содержащиеся в белке штамма HR, полностью отсутствуют в белках других штаммов BTM. Размах вариативности в содержании тех или иных аминокислот у мутантов, как правило, достаточно широк: различия обнаруживаются не по какой-либо одной или немногим аминокислотам, а практически по большинству представленных в белке аминокислот. Так, из 13 исследованных штаммов BTM статистически достоверные различия обнаружены в отношении 15 из 18 аминокислот.

Интересное исследование в этом направлении проведено Ахом [12], проанализировавшим аминокислотный состав белка дикого штамма BTM *vulgaris* и трех его последовательно полученных мутантов: *flavum*→*pesans*→*revirescens*, а также дикого штамма *dahlemense* и полученного из него мутанта *luridum*. Между аминокислотным составом диких штаммов обнаружены значительные различия по 8 аминокислотам; различия между мутантами одной линии носили хотя и менее выраженный, но статистически достоверный характер. На основании обнаруженных автором различий в аминокислотном составе белка мутантов можно сделать вывод, что при молекулярном весе пептидной цепочки BTM около 18/270 и вхождении в нее 164 остатков аминокислот мутация *vulgaris*→*flavum* сопровождается заменой в пептидной цепочке одного остатка валина и одного остатка аланина двумя остатками аспарагиновой кислоты; мутации *flavum*→*pesans* соответствует

Таблица 4

некоторых штаммов вирусов

Вирус мозаики						Вирус гриппа		Вирус кустистой карликовости томатов		
B2A	B-3	B-4	S-1	S-2	S-3	PR-8	Lee	BS-3	BS-9	BS-10
7,8	7,8	—	4,7	4,5	5,3	2,0	2,1	4,7	4,9	4,8
9,9	—	—	—	—	—	4,5	3,6	5,7	5,9	5,7
—	—	12,7	—	—	—	6,4	6,4	9,2	9,5	9,2
—	—	—	—	—	—	—	—	0,6	0,6	0,6
—	—	—	—	—	—	6,8	6,5	5,0	5,1	4,9
—	—	—	—	—	—	1,9	2,2	4,0	4,2	4,1
2,5	—	—	—	—	—	1,2	1,3	1,2	1,3	1,2
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	3,6	2,7	3,0	2,7
—	—	—	6,3	6,0	6,2	4,6	4,7	8,9	9,1	8,9
—	—	—	—	—	—	3,2	4,1	3,1	3,1	3,1
1,9	—	—	—	—	—	2,0	1,9	0,7	0,9	1,0
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	3,0	3,7	3,9	3,7
—	—	—	6,1	5,9	6,1	2,2	2,3	2,8	2,7	2,7
8,8	9,1	—	—	8,7	9,0	1,8	1,8	5,6	5,3	5,5
11,0	12,1	—	—	—	—	3,4	3,2	8,1	8,2	8,0
—	—	—	—	—	—	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
—	—	—	—	—	—	1,9	2,0	3,1	3,4	3,3
—	—	—	—	—	—	2,7	2,7	7,3	7,0	7,2
9,9	10,3	10,8	—	—	—	—	—	—	—	—

для сравнения с колонкой до HR штамма включительно; во второй колонке (++) — между первой (+) и второй (++) колонкой вызваны тем, что содержание аминокислот в штаммах вируса табачной мозаики определялось микробиологически с 5-летним

сопровождается потерей одного остатка валина, заменяемого одним остатком аспарагина; мутация *dahlemense*→*luridum* обуславливает замену одного остатка глутаминовой кислоты одним остатком лейцина.

В то же время аминокислотный состав некоторых штаммов оказывается практически идентичным, как, например, в случае классического и маскированного (М) штаммов BTM, хотя биологические свойства этих штаммов значительно различаются. Точно так же не удалось до сих пор установить отличий в аминокислотном составе белков некоторых штаммов вируса кустистой карликовости томатов [13]. Сравнивая аминокислотный состав суммарного белка и пептидов триптического гидролизата нормального штамма BTM и полученного из него при обработке азотистой кислотой мутанта Ni54, Витман [14] пришел к выводу об отсутствии между ними различий в аминокислотном составе и последовательности аминокислот в пептидах, устанавливаемых с помощью триптического гидролиза. Возможно, что различия в белке этих штаммов связаны либо со степенью амидирования, либо с последовательностью аминокислот непосредственно в пептидах, получаемых при триптическом гидролизе. Поэтому, резюмируя имеющиеся в нашем распоряжении данные по аминокислотному набору белков у различных штаммов вирусов, можно сделать только осторожный вывод, что белковые компоненты у разных штаммов часто бывают разными.

б) Белковые субъединицы

Интенсивное изучение структуры белковых субъединиц проведено на штаммах BTM. Выводом из вирусных частиц карбоксипептидазой, оказался

ксипептидаза отщепляет около 2900 ± 100 треониновых остатков на моль вирусного белка. Так как каждый треониновый остаток, удаляемый карбоксипептидазой, представляет собой одну пептидную цепь, то при расчете на молекулярный вес ВТМ, равный 50 млн., величина молекулярного веса пептидной цепочки будет равна 17 000. Аналогичный молекулярный вес для пептидной цепи получается при расчете по цистеину, который присутствует в белке всех 13 штаммов ВТМ в постоянном и притом минимальном количестве. Принимая во внимание, что в пептидную цепь входит один цистеиновый остаток, при содержании цистеина 0,68% величина молекулярного веса пептидной цепи составит 18 000. Прямое определение молекулярного веса структурных субъединиц после обработки ВТМ додецилсульфатом натрия (детергент, рвущий водородные связи) дает ту же величину ($18\,800 \pm 10\%$).

Если такие субъединицы, полученные в результате обработки детергентом, обработать карбоксипептидазой, то как и в случае с нативным вирусом освобождается опять-таки только треонин [18,11]. Молекулярный вес пептидной цепочки, определенный на основании рентгеноструктурного анализа, также совпадает с приведенной выше величиной. Сходные (хотя и не идентичные) данные о количестве субъединиц в вирусном белке получены и для других штаммов ВТМ. Новой работой Рамахандрана [19] установлено, что минимальная пептидная цепь в белке ВТМ имеет молекулярный вес 18 270 и содержит следующее количество аминокислотных остатков: аспарагиновая кислота — 19, глутаминовая кислота — 17, пролин — 8, серин — 18, треонин — 17, глицин — 6, аланин — 15, валин — 14, лейцин — 13, изолейцин — 9, тирозин — 4, триптофан — 2, фенилаланин — 8, цистеин — 1, лизин — 2, аргинин — 11, т. е. 164 аминокислоты.

Однако в литературе до недавнего времени существовала неясность в трактовке вопроса о взаимоотношении между нативным белком ВТМ и его полипептидными цепочками. Предполагалось [20], что нативный белок ВТМ обладает молекулярным весом около 100 000 и состоит из нескольких полипептидных цепочек. Только нативный белок способен к агрегации в вирусоподобные частицы, и распад белка до более низкомолекулярных соединений связан с его необратимой деградацией. В специальном исследовании Аусвина [21] показана ошибочность такого рода представлений. Пептидные субъединицы ВТМ с молекулярным весом 18 000 оказались способными к агрегации в вирусоподобные частицы и реконструкции с РНК в инфекционный ВТМ, что свидетельствует об идентичности «нативного» белка и полипептидной цепочки ВТМ.

Если в белке ВТМ присутствует около 2900 С-концевых аминокислот, то, естественно, должно быть и соответствующее количество N-концевых аминокислот. Однако последние в белке ВТМ не обнаружены. По этому поводу были высказаны различные гипотезы, сводящиеся к тому, что N-концевая аминокислота тем или иным способом «замаскирована» [20,22,23,24].

По более новым данным Нарита [26], циклические структуры в пептидной цепочке ВТМ отсутствуют. Из гидролизата белка ВТМ, полученного с помощью пепсина или химотрипсина, ему удалось выделить кислый пептид с молекулярным весом 310, оказавшийся ацетилсерилтирозином. По мнению Нарита, этот пептид занимает концевое положение в пептидной цепочке и не дает реакции на N-концевую аминогруппу, поскольку она замещена ацетиллом.

Последующие исследования указанного автора [26] подтвердили эту точку зрения и убедительно показали, что ацетилированный пептид действительно занимает N-концевое положение. Возражения против точки зрения Нарита, сводившиеся к тому, что ацетил-серил-тирозин может представлять собой не N-концевой фрагмент полипептидной цепочки, а боковую

пептидную цепь, присоединенную к α -аминогруппе лизина, были недавно опровергнуты Андерером [27, 28] и Цугита [29, 30].

С-концевые и N-концевые аминокислоты и размеры пептидных цепей у других вирусов изучены значительно слабее. Исследование Нью-Цзин-и [31] показало, что единственной С-концевой аминокислотой в вирусе кустистой карликовости томата является лейцин в количестве $0,175 \mu\text{M}$ на 10 мг вируса. В X-вирусе картофеля С-концевой аминокислотой оказался пролин ($0,135 \mu\text{M}$ на 10 мг вируса); в качестве С-концевой аминокислоты в вирусе огуречной мозаики № 3 и № 4 был идентифицирован аланин ($0,35 \mu\text{M}$ в вирусе № 3 и $0,34 \mu\text{M}$ в вирусе № 4 на 10 мг белка). Ни в одном из этих вирусов, как и в ВТМ, N-концевой аминокислоты обнаружить не удалось, что по аналогии может быть объяснено соединением N-концевой аминогруппы с каким-либо радикалом. На основании установленного числа С-концевых аминокислот и известного молекулярного веса этих вирусов можно подсчитать, что X-вирус картофеля состоит приблизительно из 500 субъединиц с молекулярным весом около 74 000; молекулярный вес белковой субъединицы для вируса кустистой карликовости томата оказывается равным 57 000 и для вирусов огуречной мозаики — 29 000.

Ван-Вунакис [32—34], исследовавшая белковые оболочки («тени») фага *E. coli* T2_r⁺ нашла, что они состоят приблизительно из 2000 субъединиц. N-концевой аминокислотой в белке фага является только аланин, что при молекулярном весе белковой оболочки около 150 млн. соответствует молекулярному весу субъединицы порядка 80 000. С-концевыми аминокислотами в корпускуле фага оказались лейцин (или изолейцин), валин и небольшое количество некоторых других аминокислот. О близких величинах (80 000) для молекулярного веса субъединиц головки фага сообщает Бреннер [35]. Кроме того, этим же автором произведен анализ субъединиц в стержне и чехле хвостового отростка фага T2. Оказалось, что чехол состоит из 200 спирально расположенных субъединиц с молекулярным весом около 50 000, но концевых аминокислот в чехле хвостового отростка вообще обнаружить не удалось. Стержень хвостового отростка, по данным указанного автора, состоит из субъединиц с молекулярным весом около 100 000.

Хотя данных о концевых аминокислотах в вирусных белках слишком мало, для того чтобы делать широкие обобщения, есть основания полагать, что тип и количество концевых аминокислот характерны для данного вирусного вида и его штаммов. Если это предположение окажется справедливым, то биохимики со временем будут располагать дополнительным средством для идентификации вирусных видов и мутантов. Сказанное ни в коей мере не противоречит приведенным выше данным о широком размахе вариативности в аминокислотном составе штаммов вирусов, так как однообразие концевых аминокислот отнюдь не исключает, во-первых, вхождения в пептидную цепь различных аминокислот, а во-вторых, их различную последовательность. Работами Нью-Цзин [36] и Ниу (цит. по Найту [37]) такая возможность подтверждена экспериментально.

Белок ВТМ в последние годы стал одной из моделей для расшифровки последовательности аминокислот в полипептидной цепочке. Совместными усилиями ряда исследователей выполнена огромная работа, которая в настоящее время позволяет установить очередность аминокислотных остатков на всем протяжении полипептидной цепочки, о чем уже говорилось выше.

в) Гетерогенность белка

Крайне важным, однако совершенно не исследованным в химии вирусных белков является вопрос относительно их гетерогенности. Тот факт, что ряд простейших вирусов можно получить в кристаллической форме

свидетельствует о строгой повторяемости и единообразии структур, составляющих вирусный корпускул. Работами Шрамма с сотрудниками (см. выше) показано, что белок ВТМ состоит из морфологически определенных и различных в электронном микроскопе субъединиц. Эти субъединицы обладают способностью в определенных условиях (даже при отсутствии РНК) соединяться в структуры, неотличимые от нативного вируса, что также свидетельствует о высокой степени их гомогенности.

Спрашивается, в какой мере физическая и физико-химическая однородность (обуславливающая, в частности, кристаллизацию вирусов) означает биохимическую и функциональную однородность как самих вирусных корпускул, так и составляющих их субъединиц? По данным Ключковского [38], исследовавшего белок ВТМ иммунологически с помощью диффузии преципитинов в агар, в вирусных корпускулах присутствует по меньшей мере два белка: один, известный ранее, так называемый Х-белок (или А-белок) и второй, ранее неизвестный, Y-белок. Х- и Y-белки не дают перекрестных реакций с антисыворотками, т. е. серологически неродственны. При взаимодействии антисыворотки к ВТМ с Х-белком диффузия преципитинов в агар давала две полосы, а при взаимодействии Y-белка образовывалось по крайней мере пять полос, что свидетельствует в свою очередь о серологической гетерогенности самих этих белков. К сожалению, химических анализов полученных белковых фракций произведено не было; кроме того, не исключено, что множественность полос преципитации была обусловлена, по крайней мере отчасти, денатурационными изменениями белка.

В отношении некоторых вирусов животных имеются данные, в основном морфологического характера, о неоднородности вирусного корпускула, которые можно рассматривать как косвенное свидетельство в пользу гетерогенности их белковых компонентов.

К числу таких доказательств принадлежит наличие у некоторых сложных вирусов и фагов нескольких антигенных структур, дифференциальная чувствительность различных частей вирусного корпускула к обработке кислотами и щелочами [39, 40, 41] к гидролизу протеолитическими ферментами [41]. Из четных Т-фагов удалось выделить так называемый внутренний белковый антиген, не реагирующий с антисывороткой к цельному фагу. Химические и биологические свойства этого внутреннего белка оказались крайне любопытными; в частности, его синтез в зараженной бактериальной клетке начинался в течение 2 минут после заражения, т. е. до начала синтеза фаговой ДНК. Любопытно, что заражение кишечной палочки фагом Т2, инактивированным ультрафиолетовым светом, не вызывая синтеза фаговой ДНК, индуцировало синтез внутреннего антигена с нормальной скоростью [42, 43].

Широко распространенные в медицинской вирусологии понятия «гемолизины», «гемагглютинины», «растворимые и связанные» антигены, как показали исследования последних лет, отражают не только те реакции, в которые вступает вирусная частица с антисывороткой или эритроцитами, но и соответствующие структурные компоненты, которые по химическому составу и физической структуре отличаются от основной массы вирусного белка [44, 45, 46, 47, 48].

Весьма вероятно, что ферментная активность, обнаруживаемая у ряда вирусов, также связана с некоторыми специфическими белками, отличающимися от основной массы вирусного белка, хотя прямые доказательства этого отсутствуют.

Подводя итоги сказанному, следует признать, что по вопросу о гетерогенности вирусных белков в настоящее время имеются лишь отрывочные сведения. Хотя достоверность некоторых из этих данных в ряде случаев вызывает сомнение, тем не менее ряд факторов достаточно убедительно свидетельствует в пользу химической и структурной неоднородности белка ви-

тав-
ше)
раз-
ают
едн-
ель-
род-
ает
гор-
38],
ци-
два
вто-
ак-
ист-
ала
ере
ген-
ных
но-
от-
ном
ко-
ро-
ых
ув-
ло-
11].
ый
кие
бо-
на-
вой
ви-
К,
3].
ге-
как
, в
но
ос-
ел-
да
ю-
ва
ро-
ые
ев
зи-
зи-

русов. Кроме того, существует ряд косвенных данных, как, например, дифференцированная устойчивость вирусных частиц к действию протеолитических ферментов и некоторых химических веществ, которые можно объяснить только с точки зрения гетерогенности вирусного белка.

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ВИРУСОВ

а) Типы нуклеиновых кислот

Вторым компонентом вирусных частиц являются нуклеиновые кислоты: либо РНК, либо ДНК, либо обе вместе. Во всех исследованных до сих пор вирусах растений обнаружена пока только РНК, но возвести данный факт в закономерность не представляется в настоящее время возможным, так как детальному химическому исследованию подверглось лишь сравнительно небольшое количество вирусов этой группы. Все исследователи, изучавшие нуклеиновые кислоты бактериофага, единодушно сходились в том, что в фаговых корпускулах в большом количестве присутствует ДНК. Однако имеются работы, в которых сообщается о наличии в фаге и небольшого количества РНК. Вопрос о присутствии РНК в частицах фага T_2^+ был решен недавно тщательным исследованием Волкина [49], показавшего, что количество РНК в суспензии фаговых частиц, подвергнутых обработке рибонуклеазой, не превышает 0,025% общего фосфора фага. Следовательно, в фаговом корпускуле может присутствовать не более одной молекулы РНК с молекулярным весом 35 000, что является маловероятным. В какой мере это справедливо для других фагов — неизвестно; можно лишь предположить, что ввиду большого сходства Т-фагов в остальных фагах этой серии, как и в T_2^+ РНК отсутствует.

Совершенно уникальная по своим свойствам ДНК была обнаружена в мелких фагах, лизирующих *Escherichia coli* $\phi X174$ и S13 [50, 54]. Оказалось, что эффективность инактивации этих фагов в результате распада P^{32} была в 10 раз выше, чем у фагов Т-серии, приближаясь к 1. Иными словами, распад единственного атома P^{32} в молекуле ДНК этих фагов вызывает полную инактивацию частицы, тогда как у фагов Т-серии потеря биологической активности наступает только после распада приблизительно 10 атомов радиоактивного фосфора. Глубокие различия между фагом $\phi X174$ и фагами Т-серии обнаружило также и изучение особенностей мутационного процесса под влиянием азотистой кислоты. Если мутанты фага $\phi X174$ возникали в чистых клонах, то мутанты фага Т4 — в смешанных клонах. Такие различия в характере мутационного процесса могут иметь место лишь в том случае, если фаг $\phi X174$ обладает одной копией генетического материала, тогда как у фага Т4 генетический материал закодирован дважды. На основании этих данных Синсгеймером и Тесманом было выдвинуто смелое предположение, что ДНК в этих фагах представляет одноцепочную молекулу, а не двойную спираль комплементарных полинуклеотидных цепей, как это имеет место во всех изученных до сих пор образцах ДНК. Последующее прямое биохимическое и биофизическое исследование подтвердило такую точку зрения. ДНК фага $\phi X174$ как в свободном состоянии, так и в составе вирусных частиц обнаружило необычную для дезоксирибонуклеиновых кислот способность реагировать с формальдегидом, что свидетельствует о наличии в азотистых основаниях ДНК свободных аминогрупп, не связанных водородными связями. Нуклеотидный состав этой ДНК, установленный с помощью различных методов гидролиза, не соответствовал так называемому правилу Чаргаффа, т. е. в ДНК отсутствовало равенство отношений пуринов к пиримидинам: аденина — к тимину, гуанина — к цитозину.

Тщательное изучение физико-химических и оптических свойств только укрепило исследователей во мнении, что молекула нуклеиновой кислоты из фага ϕ X174 представляет гибкую одинарную полинуклеотидную цепь, в которой не все аминокислотные азотистые основания связаны водородными связями.

В вирусах насекомых, как правило, присутствует только ДНК [55], однако, по данным Крига, [56, 57] у полиэдрического вируса *Smit hia rudibunda*, тельца включения которого локализованы в цитоплазме, содержится РНК. Для окончательного суждения о типе нуклеиновой кислоты у вирусов насекомых необходимы более широкие и тщательные исследования.

Наиболее пеструю группу по составу нуклеиновых кислот представляют вирусы животных. Такая пестрота, с одной стороны, обусловлена действительно наличием у вирусов этой группы обоих типов нуклеиновых кислот (как вместе, так и порознь), но с другой — значительная часть противоречивых данных по составу нуклеиновых кислот этих вирусов связана с большими трудностями очистки их от нуклеиновых кислот клеток хозяина. В виде примера можно сослаться на вирус гриппа, у которого ряд исследователей находил то одну РНК или ДНК, то обе вместе в различных количественных соотношениях. По последним данным Барка [58], анализировавшего высокоочищенные препараты штаммов WS, MEZ и Persia вируса гриппа, в них обнаружена только РНК. Содержание ДНК в этих препаратах не превышало 0,009—0,02%, что было обусловлено, по его мнению, загрязнением ДНК из клеток хозяина.

Факт совместного присутствия РНК и ДНК в вирусных частицах представляет, несомненно, значительный интерес. В настоящее время он с достоверностью установлен лишь для риккетсий и, может быть, для вируса пситтакоза и менингопневмонии. Исследователи, отрицавшие наличие РНК у риккетсий [59], не учитывали, очевидно, того обстоятельства, что РНК риккетсий, по данным Кона [60], является крайне нестабильной и легко теряется частицами в нейтральной среде при 36° с одновременной потерей инфекционности.

Суммируя сказанное, можно сделать следующий вывод: в настоящее время нет никаких оснований считать, что наличие того или иного типа нуклеиновой кислоты является характерным для систематического положения данного вируса, не говоря уже о том, что само деление вирусов на вирусы животных, растений, насекомых и бактерий является в значительной степени условным, так как работами Блэка [61] показано, что вирусы растений могут размножаться также и в насекомых-переносчиках.

б) Содержание нуклеиновых кислот

Как видно из табл. 6, содержание нуклеиновых кислот у различных вирусов отличается крайним разнообразием: от 1% у вируса гриппа до 50% у бактериофага T2. Насколько можно судить по имеющимся в настоящее время сведениям, содержание нуклеиновой кислоты в вирусах ни в какой степени не коррелирует ни с систематическим положением вируса, ни со степенью сложности его организации. Так, среди вирусов растений ВТМ содержит лишь 6% РНК, а вирус желтой мозаики турнепса — в 6 раз больше, т. е. 35%; среди вирусов животных вирус гриппа, например, содержит РНК в 24 раза меньше, чем вирус полиомиелита (см. табл. 5).

Среди бактериофагов и вирусов насекомых различия в содержании нуклеиновых кислот выражены, правда, в меньшей степени, но это объясняется скорее всего неполнотой наших знаний об этих вирусах. Из фагов в химическом отношении изучены лишь фаги кишечной палочки T-серии, а из вирусов насекомых — не более 10—12 представителей.

Однако если содержание нуклеиновой кислоты (по крайней мере РНК) в вирусных частицах выразить не в весовых процентах, как это обычно делают, а в абсолютных весовых количествах, то мы столкнемся с обратным явлением — удивительным постоянством в содержании нуклеиновой кислоты. Об одинаковом содержании РНК у штаммов растительных вирусов первый сказал Найт [11]. Его представления получили развитие в работе Фриш-Ниггемейера [62].

Таблица 5
Содержание нуклеиновых кислот
у различных вирусов

Наименование вируса	РНК	ДНК
	в %	
Мозаики люцерны	15	—
Х-вирус картофеля	6	—
Южной мозаики фасоли	21	—
Табачной мозаики	6	—
Некроза табака	18	—
Кальцевой пятнистости табака	40	—
Карликовой кустистости томатов	17	—
Желтой мозаики турнепса	35	—
У-вирус картофеля	5	—
Желтой мозаики репы	40	—
Энцефаломиелита лошадей	4	—
Гриппа	1,06	—
Болезни Ньюкестля	6	—
Папилломы Шопа	—	8,7
Осповакцины	—	6
<i>Rickettsia burnetti</i>	4,3	9,7
Полиомиелита	24	—
Чумы птиц	3,5	—
Фаг T2	—	45—50
Фаг T4	—	40—43
Фаг T6	—	40—43
Полиэдроа <i>Borrelia opariae</i>	—	9
Полиэдроа <i>Smithia pudibundae</i>	6,7	—
Полиэдроа <i>Bombix mori</i>	—	7,9

Зависимость между процентным содержанием РНК и молекулярным весом вирусной частицы выражается графически гиперболической кривой и характеризуется уравнением:

$\% \text{РНК} \times \text{молекулярный вес частицы} = 2 \times 10^8$, что соответствует среднему содержанию РНК в одной частице около 2×10^6 или приблизительно 6000 нуклеотидам (см. рис. 1).

Реально определяемое количество нуклеотидов в вирусных РНК достаточно близко к указанной величине и отличается от нее не более чем вдвое (см. табл. 6).

По сравнению с размахом вариабельности процентного содержания нуклеиновых кислот, когда отдельные вирусы различаются между собой в 20—40 раз, отличия веса в абсолютном содержании на $\pm 80—100\%$ не имеют особого значения, тем более, что указанная величина различий представляет собой максимальные отклонения. Следует также иметь в виду, что определение молекулярного веса вирусных частиц и содержания в них нуклеиновых кислот, произведенные различными авторами с помощью разных методов, дают различные величины. Если при этих условиях получаются все-таки достаточно близкие цифры, то на основании сказанного можно думать, что в действительности эти величины должны быть еще ближе.

Таблица 6

**Процентное и абсолютное содержание РНК
у некоторых вирусов**

Наименование вирусов	Молекулярный вес частицы	Содержание РНК в %	Число нуклеотидов
Вирус табачной мозаики	$50 \cdot 10^6$	6	6 000
Х-вирус картофеля	$30 \cdot 10^6$	6	5 400
У-вирус картофеля	$75 \cdot 10^6$	5	11 300
Вирус карликовой кустистости томатов	$9 \cdot 10^6$	16	4 400
Вирус южной мозаики фасоли	$6 \cdot 10^6$	21	3 800
» желтой мозаики репы	$5 \cdot 10^6$	40	6 000
» кольцевой пятнистости табака	$6 \cdot 10^6$	40	7 300
Вирус некроза табака	$6 \cdot 10^6$	18	3 300
» полиомиелита	$10 \cdot 10^6$	24	7 300
» гриппа	$100 \cdot 10^6$	2	6 000
» чумы птиц	$100 \cdot 10^6$	2	6 000

Зависимость между содержанием РНК и молекулярным весом вирусов выражается и в так называемой величине b_v , определяемой спектрофотометрически и характеризующей отношение поглощения нуклеиновокислого и белкового компонентов вирусной частицы при 280 и 260 $m\mu$ (за минусом светорассеяния). Если величины молекулярного веса и b_v для ряда растительных вирусов отложить в системе полулогарифмических координат, то зависимость между этими величинами выразится прямой линией. В общем случае чем выше величина b_v , тем выше молекулярный вес вируса [63].

Разумеется, трудно сказать, в какой мере эта зависимость носит универсальный характер и какие фундаментальные свойства вирусов она выражает. Небольшое количество фактов, на которых она основана, не дает возможности ни решить эти вопросы, ни полностью исключить возможность случайного совпадения. По имеющимся в настоящее время сведениям, абсолютное содержание ДНК в вирусных частицах такой закономерности не подчиняется. Однако даже при самом осторожном подходе можно предположить, что в основе некоторых групп вирусов, включающих по крайней мере вирусы растений и животных, лежит какая-то элементарная единица рибонуклеопротеидной природы с константным отношением РНК и белка. Можно думать, что отобранный в процессе эволюции такой оптимальный по ряду причин вариант рибонуклеопротеида мог послужить основой для дальнейшего эволюционного усложнения, коснувшегося, однако, внешних компонентов элементарной вирусной частицы, но не его внутреннего ядра. Даже если единая эволюция вирусов и отсутствует, то этот элементарный нуклеопротеид, очевидно, представляет собой такой оптимальный и в то же время простой вариант биологической структуры, который независимо возникал на разных путях эволюции.

в) Состав нуклеиновых кислот

В состав вирусных нуклеиновых кислот входят обычные азотистые основания: аденин, гуанин, цитозин, урацил (в РНК) и тимин (ДНК). В ДНК четных фагов вместо цитозина содержится его производное — 5-оксиметилцитозин. Следует отметить, что за последние годы в ДНК и РНК, выделенных из различных источников, обнаружен ряд новых пуриновых и пиримидиновых оснований, присутствующих в минимальных количествах.

К сожалению, вирусные нуклеиновые кислоты, за исключением может быть РНК, ВТМ, в этом отношении еще не исследованы. Вопрос о необычных компонентах, представленных хотя бы в минимальных количествах в ДНК и РНК вирусов, следует подвергнуть самому тщательному исследованию, принимая во внимание ту роль, которая приписывается 5-оксиметилцитозину ДНК четных фагов в изменении обмена клетки хозяина в сторону синтеза вирусного корпскулла.

Работами последних лет выявлена возможность включения в нуклеиновые кислоты вирусов ряда необычных оснований: тиюрацила, 8-азогуанина, 5-йодурацила, 5-фторурацила, 5-фторурацила и 5-бромуррацила [64—68]. Эти аналоги в зависимости от условий эксперимента могут замещать от 30 до 98% естественных азотистых оснований вирусной нуклеиновой кислоты.

Вторым компонентом нуклеиновых кислот является сахарный остаток, который идентифицируется обычно на основании весьма ненадежных цветных реакций. Более точные хроматографические методы определения применяются несравненно реже и, кроме того, ими, как правило, определяют лишь природу сахара, связанного с пуринами. Обычный химический прием — выделение сахара в кристаллическом виде с последующим определением точки плавления и оптического вращения — применялся только в отношении ВТМ. Мак Дональд [69] выделил из кислотных гидролизатов РНК четырех штаммов ВТМ кристаллический D-рибозо-п-пропилмеркаптал (т. е. идентифицировал сахарный компонент, связанный с пуриновым основанием), а Швердт [70] после предварительного восстановления получил в мягких условиях гидролиза сахарный компонент, связанный с пиримидиновым основанием. И в том, и в другом случае сахар оказался типичной D-рибозой. Что касается сахарного компонента ДНК вирусов, то он идентифицировался хроматографически или по цветным реакциям как 2-дезоксиробоза. Все это, разумеется, не дает основания считать, что в вирусных нуклеиновых кислотах отсутствуют другие сахара, кроме D-рибозы в РНК и 2-дезоксиробозы в ДНК. В качестве примера можно указать на обнаружение в ДНК четных фагов Т-серии наряду с дезоксирибозой глюкозы. По данным Есайтис [71], глюкоза связана с апуриновой частью молекулы ДНК в форме глюкозида оксиметилцитидиловой кислоты. Судя по количественным соотношениям дезоксирибозы, оксиметилцитозина и глюкозы, оксиметилцитидиловая кислота может присутствовать как в форме моноглюкозида, так и в форме дисахарида.

Таблица 7

Состав РНК некоторых вирусов

Наименование вирусов	Молярные отношения нуклеотидов						
	аденин	гуанин	цитозин	урацил	пурины/пиримидины	аденин + урацил/гуанин + цитозин	аденин + цитозин/гуанин + урацил
Вирус табачной мозаики	1,20	1,01	0,74	1,06	1,23	1,29	0,94
» огуречной мозаики	1,03	1,03	0,75	1,21	1,05	1,26	0,80
» карликовой кустистости томата	1,10	1,11	0,82	0,98	1,23	1,08	0,92
» желтой мозаики турнепса	0,91	0,69	1,53	0,89	0,66	0,81	1,35
» южной мозаики фасоли	1,03	1,04	0,92	1,01	1,07	1,04	0,95
Х-вирус картофеля	1,37	0,87	0,91	0,85	1,27	1,18	1,32
Вирус некроза табака	1,12	0,98	0,88	1,03	1,10	1,16	1,00
» гриппа	1,00	0,76	0,99	1,28	0,77	1,30	0,97

Из табл. 7 видно, что РНК вирусов в отличие от микробных и тканевых РНК имеют вполне определенную индивидуальность и далеко идущие отличия. Отношение пурины/пиримидины, составляющее 0,66 для вируса

желтой мозаики турнепса и 0,77 для вируса гриппа, равно у X-вируса картофеля 1,27 и у вируса табачной мозаики — 1,23, т. е. различается почти вдвое. Отношение аденин+урацил/гуанин+цитозин, равное 0,81 у вируса южной мозаики турнепса, составляет для вируса гриппа 1,30. Однако в настоящее время имеется еще слишком мало данных для того, чтобы делать окончательные выводы о принципиальных отличиях вирусных РНК от тканевых и бактериальных, по крайней мере в части, касающейся широких различий в составе. К сожалению, лишь немногие вирусные РНК анализировались современными методами, сводящими к минимуму (если не исключаящими) возможность изменений состава за счет методов обработки. В этом плане необходимо отметить, что, по данным табл. 7, отношение аденин+цитозин/гуанин+урацил, которое, согласно «правилу Чаргаффа», должно быть равно 1, в РНК X-вируса картофеля составляет 1,32, а в РНК вируса желтой мозаики турнепса — 1,35. И хотя имеются некоторые основания предполагать, что РНК вирусов структурно отличается от РНК других источников, тем не менее желательно подвергнуть полученные данные по составу этих РНК более тщательной проверке.

Таблица 8

Состав ДНК некоторых вирусов

Наименование вирусов	Молярные отношения оснований						
	аденин	гуанин	цитозин	тимин	5-оксиметил-цитозин	пурины/пиримидины	аденин+тимин/гуанин+цитозин
<i>Rickettsia burnetti</i>	29,5	22,5	22,0	26,0	—	1,08	1,25
<i>Rickettsia prowazeki</i>	35,1	15,7	15,1	34,1	—	1,03	2,25
<i>Rickettsia rickettsia</i>	33,4	19,4	18,1	29,2	—	1,11	1,67
Вирус осповакцины	29,5	20,6	20,0	29,9	—	1,02	1,46
Полиэдрический вирус <i>Porthetriadispor</i>	21,2	30,5	28,2	20,06	—	1,07	0,71
Полиэдрический вирус <i>Lymantria monacha</i>	24,6	26,8	24,7	23,8	—	1,06	0,94
Полиэдрический вирус <i>Christoneura fumiferana</i>	24,8	26,7	24,5	24,0	—	1,06	0,95
Полиэдрический вирус <i>Ptychopoda seriota</i>	26,7	24,4	23,2	25,7	—	1,04	1,10
Полиэдрический вирус <i>Molacosoma americanum</i>	29,2	22,5	20,2	28,0	—	1,07	1,34
Полиэдрический вирус <i>Molacosoma distria</i>	29,2	21,9	20,3	28,5	—	1,05	1,36
Полиэдрический вирус <i>Bombix mori</i>	29,3	22,5	20,2	28,0	—	1,07	1,34
Полиэдрический вирус <i>Calias philodice eurytheme</i>	29,9	22,4	20,1	27,6	—	1,09	1,35
Полиэдрический вирус <i>Neodiprion sertifer</i>	32,3	19,5	17,9	30,3	—	1,07	1,67
Капсульный вирус <i>Cocosecia murinana</i>	31,1	19,7	17,8	30,5	—	1,07	1,67
Капсульный вирус <i>Christoneura fumiferana</i>	32,8	18,4	16,4	32,4	—	1,05	1,87
Бактериофаг T2	32,3	17,6	—	33,4	16,7	1,00	1,91
Бактериофаг T4	32,2	18,0	—	33,5	16,3	1,02	1,91
Бактериофаг T3	22,8	23,5	—	27,8	26,3	0,86	1,01
Бактериофаг T5	30,3	19,5	—	30,8	19,5	0,97	1,57
Бактериофаг ϕ X174	24,3	24,1	18,5	32,7	—	0,95	1,34

В табл. 7 обращает на себя внимание также необычно низкое по сравнению с тканевыми и бактериальными РНК отношение пурины/пиримидины в РНК вируса гриппа и желтой мозаики турнепса. Если только это обстоятельство не вызвано частичным отщеплением пуринов в процессе обработки,

то оно представляет несомненный интерес, так как большинство исследованных до сих пор РНК животных и бактерий содержит или примерно равное количество пуринов и пиримидинов или наибольший избыток первых. По крайней мере в отношении РНК вируса гриппа, анализ которой [58] производился *in toto* [73], можно думать, что преобладание пиримидинов над пуринами не является артефактом.

Состав ДНК различных вирусных видов, суммированный в табл. 8, обнаруживает еще более ярко выраженную видовую специфичность, вполне соизмеримую с отличиями в составе тканевых и бактериальных ДНК. При изменении от 0,71 (ГЦ тип) у полиэдрического вируса *Poethetria dispar* до 2,25 (АТ тип) у *Rickettsia prowazeki*. С другой стороны, у полиэдрического вируса *Ptychopoda seriota* это отношение близко к 1. В пользу достоверности приведенных данных свидетельствует тот факт, что состав этих ДНК хорошо соответствует «правилу Чаргаффа».

Как отмечалось выше, штаммы и мутанты одного вирусного вида отличаются друг от друга по аминокислотному составу. В противоположность этому суммарный состав нуклеиновых кислот у мутантов и штаммов вирусов оказывается практически идентичным. Некоторые данные по суммарному составу РНК и ДНК мутантов ВТМ, карликовой кустистости томатов, гриппа и бактериофага представлены в табл. 9. Интересно

Таблица 9

Состав нуклеиновых кислот некоторых штаммов вирусов

Наименование вирусов	Аде- нин	Гуа- нин	Цито- зин	Окси- метил- цито- зин	Ура- цил	Тимин
Вирус табачной мозаики:						
1) обычный штамм	24,1	27,7	19,7	—	28,4	—
2) маскированный штамм	24,5	27,5	19,7	—	28,2	—
Вирус гриппа:						
1) штамм WS	24,9	17,9	24,4	—	32,7	—
2) штамм MEZL	24,6	17,7	24,4	—	32,2	—
3) штамм Persia	24,7	18,6	24,7	—	31,9	—
Вирус карликовой кустистости томатов:						
1) штамм BS 3	25,6	27,9	20,7	—	25,7	—
2) штамм BS 9	25,6	28,0	20,6	—	25,6	—
3) штамм BS 10	25,8	28,1	20,4	—	25,6	—
Бактериофаг E. coli:						
1) T ₂ ⁺	32,0	18,0	—	16,8	—	33,3
2) T ₂ ⁺	32,3	17,6	—	16,7	—	33,4
3) T ₄ ⁺	32,3	18,3	—	16,3	—	33,1
4) T ₄ ⁺	32,2	18,0	—	16,3	—	33,5
5) T ₆ ⁺	32,5	17,8	—	16,3	—	33,5
6) T ₆	32,3	17,7	—	16,6	—	33,4

отметить сходство нуклеотидного состава РНК классического и НР-штаммов ВТМ, различающихся по аминокислотному составу. Анализы нуклеотидного состава РНК 14 других штаммов ВТМ, проведенные Найтом [75] и Блэком [61], также свидетельствуют о тождественности их суммарного состава. На этом основании можно считать, что старые данные Маркхема [72] о различиях нуклеотидного состава РНК у штаммов ВТМ являются ошибочными.

Сходство состава нуклеиновых кислот у штаммов, отличающихся по белковому компоненту и биологическим свойствам, поднимает проблему первостепенной важности, к разрешению которой следует подходить с ос-

торожностью. Поэтому необходимо совершенно точно установить те пределы, когда мы действительно можем говорить о сходстве или даже о тождестве нуклеиновых кислот.

Во-первых, средняя ошибка лучших методов для определения *in toto* состава ДНК и РНК составляет 2,5—3%; следовательно различия в составе нуклеиновых кислот, лежащие в этих пределах, вообще не улавливаются, а различия порядка 3,5—4% трудно считать статистически достоверными. Если принять, что РНК одного вируса, содержащая в среднем около 6000 нуклеотидов, отличается от РНК другого вируса на 180—250 нуклеотидов, то такие различия с помощью существующих методов исследования уловить невозможно. Средняя ошибка метода для определения ДНК несколько меньше, но зато количество нуклеотидов (молекулярный вес около 5—6 млн.) больше, так что в итоге величины «неулавливаемых различий» для ДНК будут приблизительно такими же, как и для РНК. При современном уровне знаний о генетической роли нуклеиновых кислот совершенно невозможно даже в грубом приближении решать вопрос о том, какова количественная корреляция между содержанием тех или иных нуклеотидов и тех или иных аминокислот в белке, т. е. каков так называемый коэффициент кодирования нуклеиновой кислоты, если рассматривать последнюю как «код», в котором «записано» содержание и последовательность аминокислот [76].

Во-вторых, речь шла лишь об определении суммарного состава нуклеиновых кислот, однако за последние годы получено значительное количество данных, говорящих в пользу гетерогенности суммарной клетки ДНК и РНК. И, наконец, в-третьих, молекулы нуклеиновой кислоты, обладающие одинаковым суммарным составом, но различающиеся последовательностью нуклеотидов, будут в принципе с химической и генетической точки зрения совершенно разными. В настоящее время биохимики не располагают еще методом определения последовательности нуклеотидов в полинуклеотидной цепочке. Однако в последние годы были разработаны некоторые приемы, позволяющие судить о том, совпадает ли последовательность нуклеотидов в анализируемых нуклеиновых кислотах или нет, т. е. судить о «суммарной» их последовательности без детального анализа. Укажем на некоторые из этих работ. Так, Редди [77] гидролизировал рибонуклеазой РНК из четырех штаммов ВТМ и исследовал сравнительный состав отщепляющихся мононуклеотидов. По его данным, единственными нуклеотидами, отщеплявшимися от РНК всех штаммов, были уридилловая и цитидилловая кислоты. В мононуклеотидной фракции РНК ВТМ и штаммов НР и УА содержалось 48,1—50,7% уридилловой и 42—45,7% цитидилловой кислот, тогда как в мононуклеотидной фракции РНК штамма М содержание этих компонентов составляло 70,8 и 61,2% соответственно. На основании полученных данных Редди делает вывод, что распределение пиримидиновых нуклеотидов в РНК штамма М значительно отличается от других штаммов ВТМ, несмотря на сходство суммарного состава их нуклеиновой кислоты. В то же время, по данным другой работы Редди [78], негидролизующиеся рибонуклеазой «ядра» РНК из 5 штаммов ВТМ оказались идентичными. При тщательном анализе ДНК четных Т-фагов, произведенном Есайтис [71], также обнаружено наличие определенных структурных различий между ДНК, не отличающихся по суммарному составу. По ее данным, ДНК фагов Т2, Т4 и Т6 содержали соответственно: азота 14,3, 13,9 и 13,1%; фосфора — 8,45, 8,03 и 7,62%; дезоксирибозы — 19,8, 19,6 и 18,7%; глюкозы — 6,55, 8,32 и 12,5%. Основное количество глюкозы присутствовало в форме глюкозида оксиметилцитидилловой кислоты. В ДНК фага Т2 была выявлена как незамещенная оксиметилцитидилловая кислота, так и ее моноглюкозид, в ДНК фага Т4 — только моноглюкозид оксиметилцитидилловой кислоты, а в ДНК фага Т6 — незамещенная оксиметилцитидилловая кислота и ее дисахарид. Следовательно,

ДНК фаг
жанию аз
ным комп

По с
ДНК не
из вирус
за счет де
ненных н
ном весе
ределяет
ный вес в
лярный
ального
мочности
ломы кро
ДНК, т.
Рассчита
соответст
в частице
ная част
порядка
молекула
молекула
са одноц
10⁶. С
фага фХ
приводи
только о

Одн
ные ДН
кими мо
чены да
весах Д
сих пор
кономер
мощью а
корпуск
ной суб
мелкими
их опис
ДНК («
женная
блоков
были о
авторов
молеку
виде х
чей, да
смотря
зам, х
вагу и
делени

ДНК фагов Т-серии, обнаруживающие столь близкое сходство по содержанию азотистых компонентов, различаются не только по своим углеводным компонентам, но и структурно.

г) Молекулярные веса нуклеиновых кислот

По совершенно непонятным причинам молекулярные веса вирусных ДНК не стали предметом детального исследования, хотя выделение ДНК из вирусных суспензий гарантирует от деструктивных изменений препарата за счет действия деполимераз. Имеется лишь несколько исследований, выполненных на фагах Т-серии, в одной из которых [79] сообщается о молекулярном весе ДНК Т2 фага порядка 5—6 млн., а в другой [80], эта величина определяется порядком 10 млн. (см. табл. 10). Обычно считали, что молекулярный вес вирусных ДНК является величиной того же порядка, что и молекулярный вес нуклеиновой кислоты животного, растительного или бактериального происхождения, хотя некоторые основания для сомнения в правомочности такой точки зрения имелись и раньше. Например, вирус папилломы кроликов, обладающий молекулярным весом 47 млн., содержит 9% ДНК, т. е. «суммарный молекулярный вес» его ДНК составляет 4,2 млн. Рассчитанное содержание нуклеиновой кислоты ($0,072 \times 10^{-16}$ г) хорошо соответствует весовому количеству ДНК, найденному экспериментально в частице вируса — $0,07 \times 10^{-16}$ г (см. табл. 10). Отсюда следует, что вирусная частица обладает или одной молекулой ДНК с молекулярным весом порядка 4 млн., или несколькими молекулами, но соответственно меньшего молекулярного веса. Возможность вхождения в вирусные частицы одной молекулы ДНК подтверждается и прямым определением молекулярного веса одноцепочной ДНК из фага ϕ X174, который оказался равным $1,6—1,8 \times 10^6$. Сопоставление этой величины с тем фактом, что молекулярный вес фага ϕ X174 составляет 6×10^6 , а содержание ДНК в нем не превышает 25% приводит нас к выводу, что в этом вирусе, действительно, присутствует только одна молекула ДНК [50, 51].

Однако если в приведенных выше примерах речь шла о том, что вирусные ДНК по сравнению с ДНК других объектов могут обладать более низкими молекулярными весами, то в течение двух последних лет были получены данные, свидетельствующие о необычайно высоких молекулярных весах ДНК некоторых фагов, значительно превосходящих все известные до сих пор величины молекулярного веса нуклеиновых кислот. Исследуя закономерности репликации ДНК бактериофагов Т2- и Т4, меченных P^{32} с помощью автордиографии, Левинталь и Тессман [81, 52, 54] установили, что в корпускуле этих фагов около 40% всей ДНК входит в состав одной структурной субъединицы, тогда как остальная ДНК распределяется между более мелкими осколками, размеры которых не дают возможности исследовать их описанным способом. Судя по радиоактивности таких крупных белков ДНК («звезд» по автордиографической терминологии), величина их, выраженная в единицах молекулярного веса, достигала 45×10^6 . Размеры таких блоков не изменялись после обработки протеолитическими ферментами и были одинаковыми при различных способах выделения ДНК. По мнению авторов, эти блоки представляют собой одну молекулу ДНК, а не агрегат молекул или нуклеопротеид [82, 83]. Однако попытки выделить эту ДНК в виде химически очищенного препарата каждый раз заканчивались неудачей, давая препараты с обычными для ДНК молекулярными весами. Несмотря на устойчивость высокомолекулярных субъединиц ДНК к протеолитическим ферментам, химическим способам депротеинизации (обработка хлороформом по Сезаму или фенолом по Шрамму), обычно используемым во всех методиках выделения ДНК, вызывали резкое уменьшение размера и количества звезд.

В результате создалась сложная ситуация, когда испытанные методы химической обработки давали привычные для всех результаты, а результаты новых, еще не проверенных методов исследования далеко выходили за рамки привычных представлений. Именно поэтому данные Левинтала, известные еще с 1956 г., не получили широкого признания, пока не были подтверждены целой серией работ в 1959—1960 гг. Прежде всего высокие молекулярные веса фаговой ДНК, известные дотоле только по данным авто-радиографии, были также подтверждены результатами аналитического ультрацентрифугирования.

Как сообщил Томас [82,83], константа седиментации ДНК фага Т4 оказалась равной $41 \pm 5S$, что соответствует молекулярному весу 45×10^6 . Этим же автором высказано предположение, что низкие молекулярные веса порядка 5—6 млн., получающиеся при использовании химических способов депротеинизации, связаны не с разрушением каких-то особенных пептидных связей, устойчивых к действию протеаз, а с гидродинамическим воздействием встряхивания или гомогенизации, применяющихся в этих обработках и вызывающих разрыв фосфодиэстерных связей в молекуле. Последнее обстоятельство было подвергнуто специальной экспериментальной проверке в работах Дависона [84] и Херши [85], которые пришли к выводу, что гидродинамическое воздействие действительно способно разрушить молекулу ДНК. Согласно представлениям указанных авторов, разрыв в длинной молекуле ДНК под влиянием обработки данной интенсивности происходит примерно посередине, в результате чего образуются две молекулы приблизительно равной величины. Если интенсивность воздействия достаточно велика, то образовавшиеся обломки в свою очередь разрываются дальше, вблизи своих центров; если же энергия воздействия ниже энергетического порога, необходимого для очередного разрыва, то величина молекулы не изменяется, как бы долго при прочих равных условиях ни продолжалась обработка. Процесс распада идет по принципу «все или ничего». Уменьшение молекулярного веса молекулы ДНК под влиянием гидродинамических эффектов продолжается до тех пор, пока не будет достигнута некоторая критическая величина, устойчивая к воздействиям, обычно применяющимся при выделении ДНК. Такой величиной в среднем оказался молекулярный вес около 6 млн., который и был принят за средний молекулярный вес нативных препаратов ДНК.

В противоположность ДНК молекулярные веса вирусных РНК определялись многими исследователями самыми различными методами. Однако эти многочисленные исследования давали столь противоречащие друг другу величины молекулярных весов, что ясности в этом вопросе до самого последнего времени не было.

Таблица 10
Содержание ДНК у некоторых вирусов
в процентном и абсолютном весовом выражении

Наименование вирусов	ДНК		Количество молекул с молекулярным весом 6×10^6
	$г \times 10^{-16}$	% к весу корпускула	
Бактериофаг Т2 _г	3,6	45	36
» Т2 _г ⁺	3,2	45	32
» Т4 _г ⁺	2,3	40	23
» Т4 _г	2,4	40	24
» Т6 _г ⁺	3,4	40	34
» Т6 _г	3,4	40	34
Вирус осповакцины	3,2	5,6	32
» папилломы кро- ликов	0,07	9	0,6

Вплоть до 1959 г. различные исследователи сообщали для молекулярного веса РНК цифры от нескольких десятков и нескольких сотен тысяч до 1—2 млн. Лишь в течение двух последних лет, в основном благодаря работам Гирера, Хиноса, Бедткер и Гопкинса [86—89], утвердилось мнение, что молекулярный вес РНК ВТМ составляет $2 \pm 0,2 \times 10^6$. Однако ряд исследователей допускает, что структура, выделяемая из ВТМ и обладающая столь высоким молекулярным весом, представляет собой не единую молекулу, а агрегат субъединиц. Основываясь на своих исследованиях по распределению железа во фракциях инфекционной РНК ВТМ, полученных при ультрацентрифугировании, Лоринг с сотрудниками [90] предполагает, что РНК одной частицы ВТМ с молекулярным весом около $2,5 \times 10^6$ состоит из 10—11 полинуклеотидных цепочек с молекулярным весом $2,5 \times 10^5$, которые связываются с помощью атомов железа клешневидными связями в одну структурную единицу нативной РНК. На возможность существования более низкомолекулярных субъединиц в РНК ВТМ указывает также и Цзяо-Бэнь-цзин [91], исследовавший кинетику деградации инфекционных препаратов РНК, свободных от лабилизирующего фактора. По данным этого автора, деградация РНК при 35° идет всегда закономерно таким образом, что вначале молекула РНК распадается до $2/3$ своей исходной величины, а затем последовательно до $1/3$, $1/6$ и, наконец, $1/8$ исходной величины РНК. Дальнейший распад РНК в условиях опыта отсутствовал, на основании чего Цзяо-Бэнь-цзин и принимает фрагменты, равные $1/8$ исходной величины РНК, за размер субъединиц РНК.

д) Структура нуклеиновых кислот

Предполагается, что вирусная ДНК представляет собой две полинуклеотидные цепи, закрученные по спирали и соединенные водородными связями (между 6-амино- и 6-оксигруппами противостоящих оснований). Единственным прямым доказательством существования такой структуры у вирусных ДНК является работа Вилкинса [92], показавшего на основании изучения рентгеновской дифракции, что ДНК фага Т2 состоит из двойной спирали, «прошитой» Н-связями.

Исключение представляет ДНК одноцепочного типа фага ϕ X174, S13 и некоторых других фагов, однако насколько распространен такой тип нуклеиновой кислоты у других вирусов, пока неизвестно.

Значительно более сложен вопрос о структуре РНК. В 1958 г. Хиноза [88] высказал предположение, что РНК ВТМ не соответствует структурной модели Ватсона-Крика для ДНК. Предположение основывалось на изучении кинетики потери инфекционности и молекулярного веса РНК в результате тепловой денатурации и гидролиза рибонуклеазой. Оказалось, что оба этих процесса протекают как реакция первого порядка с теплотой активации ΔH , равной 19 ккал/моль, и энтропией активации ΔS , равной 19,5 единиц энтропии. Кроме того, ряд других свойств РНК также заставил предположить в ней наличие особой структуры.

Во-первых, из ряда закономерностей, предусмотренных «правилом Чаргаффа» для ДНК, РНК подчиняется только одной — равенству числа оснований с 6-амино- и 6-оксигруппами (см. табл. 7). Во-вторых, в противоположность ДНК двойное лучепреломление в потоке РНК ВТМ является положительным. В-третьих, РНК легко реагирует с формальдегидом и адсорбируется активированным углем, тогда как эти агенты совершенно не действуют на ДНК, поскольку основания, с которыми они реагируют, находятся внутри двойной спирали и блокированы Н-связями. В-четвертых, для расщепления РНК рибонуклеазой характерно отсутствие лаг-периода, всегда наблюдающегося при ферментативном гидролизе ДНК.

Все это дало основание предположить, что РНК, по крайней мере ВТМ, представляет собой в составе вируса одинарную полинуклеотидную цепь, закрученную на спирали, с ходом спирали 23 \AA и длиной 3000 \AA [93, 88]. Для молекулы с молекулярным весом 2 млн. общая длина полинуклеотидной цепи составит 33 тысячи \AA с расстояниями между атомами фосфора по длине спирали в 5 \AA . Плоскости составляющих оснований расположены параллельно длинной оси спирали, что объясняет особенности двойного лучепреломления в потоке РНК ВТМ. Тот факт, что раствор РНК сохраняет на холоду в течение нескольких дней после выделения положительное двойное лучепреломление и биологическую активность, заставляет думать, что имеются какие-то силы, стабилизирующие молекулу. По предложенной выше схеме, единственными стабилизирующими силами могут быть Н-связи между парами оснований двух витков спирали. При этом, однако, придется также допустить для РНК *in vitro* возможность некоторого сжатия спирали по длинной оси, поскольку расстояние 23 \AA слишком велико для образования стабильных водородных мостиков. В признании существования таких стабилизирующих связей в частице вируса, очевидно, нет необходимости в силу пространственной адекватности белковой спирали оболочки и спирали РНК.

Как показали исследования Гошенмейера [18], молекулярная конфигурация РНК ВТМ *in vitro* в значительной степени зависит от окружающих условий среды, в частности от присутствия ионов металлов, и может существовать в двух формах: так называемой РНК I и РНК II. РНК I получается при выделении в среде, содержащей минимальное количество металла. Константа седиментации этой формы РНК при осаждении в ультрацентрифуге из разбавленных солевых растворов была меньше 5S РНК II, полученная в присутствии ионов металлов (особенно дивалентных), обладает более низкой величиной поглощения в ультрафиолетовом свете, не изменяющейся при добавлении к средне моно- и дивалентных катионов и высокой константой седиментации. Различия между РНК I и РНК II обусловлены присутствием значительных количеств ионов металлов в молекуле РНК II. При диализе, осаждении спиртом и обработке этилен-диаминтетрауксусной кислотой РНК переходит из формы II в форму I. Наличие гиперхроматического эффекта при возникновении связи между РНК и катионом свидетельствует о значительном изменении молекулярной конфигурации, обусловленном, вероятнее всего, образованием водородных связей. Скорее всего, РНК I в водной среде находится в виде беспорядочного клубка молекул, тогда как РНК II представляет собой в значительной степени упорядоченную спиралевидную структуру. Эти две формы РНК взаимно переходят друг в друга. По данным ультрацентрифугирования, в препарате РНК II 40—60% всего материала входит в гомогенный пик с константой седиментации 22 S, тогда как в препарате РНК I количество гомогенного материала нестабильно и часто представлено непрерывным рядом констант седиментации от 5 до 20 S, что, вероятнее всего, связано с различным и широко варьирующим содержанием ионов металлов. Однако, несмотря на различия в физико-химических свойствах, и та, и другая формы РНК обладают равной биологической активностью.

Этот же процесс был детально изучен в работах Л. Н. Гавриловой, А. С. Спирина и А. И. Белозерского [94, 95], которым удалось установить наличие определенной зависимости между величиной изменения приведенной вязкости РНК ВТМ и температурой: увеличение вязкости было самым высоким у наиболее инфекционных препаратов и полностью отсутствовало у препаратов РНК, лишенных активности. На этом основании авторы приходят к выводу, что зависимость между приведенной вязкостью и температурой представляет собой четкий критерий для различия инфекционных пре-

паратов РНК ВТМ. С этим положением тесно связан и второй вывод авторов о том, что наличие такого четкого и значительного физико-химического различия между инфекционными и неинфекционными препаратами свидетельствует о связи биологической активности с нативным состоянием основной массы молекул РНК, а не с какой-либо небольшой фракцией в препарате РНК. Однако последнее утверждение является весьма дискуссионным. В литературе в настоящее время имеется значительное количество данных, свидетельствующих о том, что инфекционность препарата РНК ВТМ связана как раз с небольшой фракцией молекул в препарате [96, 97, 98]. Для исследования гетерогенности препарата инфекционной РНК ВТМ в отношении биологической активности и содержания железа Лоринг с сотрудниками разработал новую технику ультрацентрифугирования с применением иммобилизирующих сред, позволившую свести до минимума перемешивание слоев при остановке центрифуги и взятии проб. Сравнение специфической инфекционности верхнего, среднего и нижнего слоев надосадочной жидкости показывает, что в препарате РНК ВТМ, выделенном с помощью фенола или додецилсульфата натрия, подавляющая часть специфической инфекционности сосредоточена в нижнем слое. Эти данные свидетельствуют о том, что суммарная инфекционность в исходном препарате обусловлена высокоинфекционным компонентом, составляющим не более 3% исходного количества нуклеата.

Концентрирование инфекционности в осадке в опытах Лоринга нельзя объяснить ни присутствием неразрушенного вируса, так как биологическая активность быстро разрушалась при стоянии, ни возможной полной или частичной реконструкцией вируса, так как стояние центрифугированного раствора сопровождалось выравниванием инфекционности в различных фракциях и восстановлением исходной ее величины.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что биологическая активность препарата РНК ВТМ связана с небольшой частью молекул РНК, обладающих наивысшей в препарате константой седиментации. Правда, Лоринг идет дальше, допуская, что инфекционность этих молекул РНК обусловлена их соединением с каким-то компонентом неустановленной природы, содержащим в своем составе железо. Этот вывод, безусловно, нуждается в тщательных дополнительных доказательствах, поскольку никаких других веществ, кроме металлов, до сих пор в препарате РНК обнаружить не удалось.

ПРОЧИЕ КОМПОНЕНТЫ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ

Вопрос о наличии в составе вирусов, кроме белка и нуклеиновой кислоты, еще липидов и углеводов представляет довольно сложную проблему для исследователей. Дело в том, что обнаруживаемые в составе вирусных препаратов липиды и углеводы могут, с одной стороны, являться интегральной частью вирусных корпускул, а с другой, могут быть и результатом загрязнения компонентами клетки хозяина, так как даже в сравнительно хорошо очищенных препаратах вируса часто присутствуют антигены клеток хозяина, отделяющиеся лишь при более тщательной очистке. К сожалению, мы до сих пор не располагаем надежными критериями для решения вопроса о связи этих компонентов с вирусной частицей. Очень часто в качестве такового критерия используется обработка вирусной суспензии каким-либо реагентом, удаляющим исследуемый компонент, с последующей проверкой биологической активности. В зависимости от того, инактивируется ли вирус при удалении данного компонента или сохраняет свою активность, и решается

соответственно вопрос о его вхождении в состав вирусной частицы. Однако при всей простоте такого методического приема необходимо иметь гарантию, что наблюдаемая потеря инфекционности не связана с применяемым методом обработки (что подчас решить практически невозможно). Необходимо также иметь в виду, что ряд компонентов вирусной частицы, например значительное количество аминокислот, может быть удален или замещен без всякой потери вирусом биологической активности. Таким образом, решение вопроса о вхождении в состав данного вируса тех или иных соединений и тем более точное определение их количественного содержания требуют особой осторожности и возможны лишь при наличии высокоочищенных вирусных препаратов.

В ряде случаев, особенно у вирусов животных, весьма распространенным компонентом вирусных частиц являются липиды. Вопрос о наличии липидов в частицах вируса гриппа, болезни Ньюкестля, энцефаломиелита лошадей и классической чумы птиц следует, очевидно, считать окончательно решенным. По последним данным Армбрустера [99], содержание липидов в высокоочищенных препаратах вируса гриппа достигает 47,9%. Из общей липидной фракции вируса гриппа Армбрустеру удалось идентифицировать 12 соединений: лецитин, сфингомиелин, коламинокефалин, три разновидности цереброзидов (различавшихся при хроматографии по величинам R_f), лизолецитин, полярные липиды (нейтральные жиры, стероиды, высшие жирные кислоты) и два соединения ганглиозидной природы. Столь же высокое содержание липидов, по данным Армбрустера, характерно и для вируса классической чумы птиц, липидный состав которого в основном сходен с вирусом гриппа, и отличается лишь меньшим количеством лецитина, отсутствием одного из цереброзидов и одного из ганглиозидоподобных веществ. По данным Фромхагена [100], исследовавшего содержание липидов у штаммов PRS, DSP, Lee вируса гриппа, все они содержали одинаковое количество ($11,5 \pm 1\%$) фосфолипидов, из которых 50% приходилось на долю кефалина, 30% — на долю сфингомиелина, 15% — на долю лецитина и 5% — на долю гликолипидов. Частицы всех трех штаммов содержали 6,5% незэстерифицированного холестерина и менее 0,3% нейтрального жира (триглицеридов). Циллиг [48] нашел в составе элементарного тельца вируса классической чумы птиц 23,5% липидов, из них 10% холестерина. Содержание липидов у вируса папилломы кроликов равно 1,5%, а у вируса энцефаломиелита лошадей оно достигает 50% [101]. По данным Франклина [102], удаление хотя бы незначительной части липидной фракции у вируса болезни Ньюкестля приводит к резкому падению инфекционности. Вирус осповакцины содержит 8,5% липидов [103], однако экстракция холестерина из состава элементарных телец не приводит к потере инфекционности [104].

Четвертым компонентом, иногда обнаруживаемым в очищенных вирусных препаратах, являются углеводы (в количестве, превышающем содержание пентоз нуклеиновой кислоты). Вопрос о наличии углеводов в составе вирусных корпускул изучен значительно хуже. Различные авторы приводят весьма противоречивые результаты исследований как по количественному, так и качественному составу углеводного компонента. В качестве примера укажем на данные Циллига [48], который нашел в составе элементарных телец классической чумы птиц 17% углеводов, и Найта [105], обнаружившего у вируса гриппа полисахариды. По сообщению Ван-Бунакис [32,33], частицы Т2-фага нейтрализуются пропердиновой системой, образующей комплексы с полисахаридами или липополисахаридами, что свидетельствует о наличии этих соединений в фаговом корпускуле.

Из других соединений следует отметить некоторое количество кислото-растворимого фосфора, обычно выделяемого из любого вирусного препарата, за исключением вирусов растений. В препаратах фагов Т-серии обнаружива-

ется до 1% кислородрастворимых соединений, что лежит, однако, на грани ошибки опыта [106]. Удаление кислоторастворимой фракции из вируса ботаники Ньюкестля не приводит даже к частичной инаktivации препарата, [102] тогда как вирусы *herpes simplex* [80] и саркомы Рауса [107] инаktivуются при инкубации с фосфатазами, что свидетельствует о поверхностной локализации каких-то важных фосфорных соединений (если, разумеется, чувствительность к фосфатазам не обусловлена частичной денатурацией вирусного корпускула).

Весьма любопытны данные о содержании меди, биотина и флавинадениндинуклеотида у вируса осповакцины [104], хотя наличие этих соединений в составе элементарных телец можно объяснить также и адсорбцией их из раствора. В составе вируса табачной мозаики Лорингом были обнаружены железо, медь, кальций, магний в количествах от 20 до 600 γ на 1 г вирусного белка. Значительные количества минеральных элементов, особенно щелочных и щелочно-земельных катионов, найдены также в составе бактериофагов Т-серии. Вопрос о том, являются ли эти вещества интегральной частью фага, до сих пор окончательно не решен. Набор этих веществ в фаговом корпускуле зависит в значительной степени от присутствия в среде Na, K, Ca и Mg и т. п. в момент синтеза вируса зараженной клеткой. Варьируя состав среды и подбирая экспериментальные условия, можно получить фаговые частицы, содержащие какой-либо один или несколько катионов. Кроме того, мутанты фага, устойчивые к осмотическому шоку, т. е. обладающие оболочками, проницаемыми для низкомолекулярных соединений, способны включать или, наоборот, терять щелочные или щелочно-земельные катионы в зависимости от ионного состава среды при выделении вирусного препарата.

Роль этих веществ в фаговом корпускуле не совсем ясна. Вероятнее всего, они связаны с нуклеиновой кислотой, нейтрализуя отрицательно заряженные группировки ДНК. Аналогичные функции в фаговых частицах выполняют также и полиамины: путресцин, спермидин, спермин. Как и у щелочных металлов, их специфичность в отношении фага выражена весьма слабо: полиамины взаимозаменяемы и их количественный и качественный состав в значительной мере зависит от присутствия этих соединений в зараженной клетке или в среде в момент выделения препарата [109].

Кроме этих щелочных катионов и полиаминов, широко варьирующих в фаге по составу и количеству, некоторое количество Ca в фаге Т2, по-видимому, прочно связано с фагом и не удаляется из корпускула ни диализом, ни отмываниями. Количество прочно связанного Ca достигает 30—40 атомов на фаговую частицу. Переход Ca в среду имеет место только при естественной или искусственной контракции хвостового отростка фага. По всей вероятности, этот Ca локализован в хвостовом отростке бактериофага и прочно связан с молекулами АТФ, входящими в сократимый белок фага и обуславливающими контракцию хвостового белка фага при инвазии фага в клетку хозяина [110].

На основании анализа приведенных данных можно сделать вывод, что вопрос о наличии в вирусных частицах других компонентов, кроме белка и нуклеиновых кислот, нуждается в дальнейшем исследовании, хотя в ряде случаев можно считать установленным присутствие в вирусных корпускулах липидов, углеводов, металлов и некоторых метаболитов. Функциональная роль этих соединений в большинстве случаев пока не ясна.

СТРУКТУРА ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ

В результате интенсивной работы, выполненной за последние годы совместными усилиями биохимиков и физиков, с большей полнотой выяснен ряд вопросов относительно структуры ВТМ. О структуре прочих вирусов,

в первую очередь бактериофагов Т-серии и некоторых вирусов животных, имеются лишь отрывочные сведения, объединяемые в схематические построения с помощью более или менее правдоподобных допущений. Естественно, что при недостатке экспериментальных фактов следует с большой осторожностью подходить к попыткам создания общих схем и механическому перенесению данных, справедливых для одних групп вирусов, на другие, даже близкородственные вирусы.

а) Локализация нуклеиновых кислот в вирусной частице

Поскольку все изученные до сих пор вирусы являются нуклеопротеидами, то первостепенный интерес для изучения структуры вирусного корпускула представляет установление взаимосвязи белка с нуклеиновыми кислотами, в частности, положения РНК или ДНК относительно белкового компонента.

Обычным приемом для выделения чистых вирусных препаратов, свободных от примесей нуклеиновых кислот клеток хозяина, является обработка нуклеазами, которые, разрушая примеси тканевых нуклеиновых кислот, совершенно не действуют на нуклеиновые кислоты и биологическую активность вирусных частиц. В то же время нуклеиновые кислоты, выделенные из вирусных частиц, равно как и нуклеиновые кислоты в денатурированных тем или иным способом вирусных частицах, легко гидролизуются, как и обычные тканевые нуклеопротеиды. Очевидно, что устойчивость вирусов различных групп к действию рибонуклеаз связана со структурными особенностями вирусных нуклеопротеидов, защищающих нуклеиновую кислоту от воздействия внешней среды.

Известно, что нуклеиновые кислоты представляют собой с химической точки зрения довольно реактивные соединения, однако в соединении с вирусным белком они химически инертны. Так, в мягких условиях, не ведущих к денатурации белкового компонента и не разрушающих вирусного корпускула, нуклеиновые кислоты вирусов не вступают в обычные для них химические реакции [11]. Например, ни ДНК фага, ни РНК ВТМ не связываются со специфичными для них красителями, но окрашиваются ими или после выделения из вирусного корпускула, или после его предварительной денатурации [111].

Все серологические свойства вирусов определяются их белковым компонентом, и удаление нуклеиновой кислоты из состава вирусных частиц не изменяет их способности реагировать с противовирусными антителами. Вирусоподобные, не содержащие РНК частицы, полученные путем агрегации А-белка ВТМ, сохраняют серологическую специфику и электрофоретическую подвижность нативного вируса [112, 113]. Хроматографическое поведение вирусов также определяется поверхностными свойствами их белков: характер элюирования нативных частиц фага Т2 и полученных из них «теней» при хроматографии на ионообменных смолах оказывается полностью идентичным, тогда как ДНК фага элюируется более высокими концентрациями солевого раствора [114]. Это свидетельствует о том, что нуклеиновая кислота вирусных частиц не оказывает влияния на их поверхностные свойства, определяемые исключительно характером и свойствами белкового компонента. Интересно отметить, что поверхностный заряд частицы и определяемая ею электрофоретическая подвижность и величина R_f при хроматографии не изменяются после удаления нуклеиновой кислоты и освобождения основных групп белка, связанных с кислыми группировками РНК или ДНК. Данный факт объясняется тем, что расположенный снаружи белковый слой окружает со всех сторон нуклеиновую кислоту вирусной

частицы, стабилизируя ее и изолируя от различных воздействий внешней среды.

Особое место занимает реакция нуклеиновых кислот в составе вирусов с различными низкомолекулярными соединениями: аналогами иприта, формальдегидом [115], нитритом [116, 117]. Сама возможность реакции в подобном случае может быть объяснена двояко: либо легкой диффузией низкомолекулярных веществ через белковую оболочку вирусных частиц, проницаемую для маленьких молекул, либо предварительной денатурацией белка под влиянием данного вида соединения и возникшей вследствие этого вторичной проницаемости белкового слоя.

В последние годы появились более прямые доказательства внутреннего расположения нуклеиновой кислоты в вирусных частицах [118]. Харт [119, 120], нагревая очищенный препарат ВТМ при 35° в слабом растворе детергента, показал, что при такой обработке происходит частичное разрушение белковой оболочки и обнажение центральной нити РНК, хорошо различимой в электронном микроскопе (см. рис. 2).

Изучение картины дифракции лучей Рентгена в очищенных препаратах ВТМ привели Уотсона [121] и Франклина [122] к выводу, что РНК, действительно, располагается по длинной оси вирусной частицы. Сравнение рентгенограммы интактного ВТМ и вирусоподобных частиц, образовавшихся в результате реагрегации А-белка, показывает, что основное различие между ними заключается в отсутствии максимума поглощения у реконструированного вируса на расстоянии 40 \AA (по радиусу) от центра частицы, где у нормального вируса локализуется РНК.

б) Взаимосвязь белка и нуклеиновой кислоты в вирусном корпускуле

Если нуклеиновая кислота вируса погружена в белковый футляр, то каков же характер сил, связывающих этих двух партнеров в молекулу нуклеопротеида? К сожалению, систематическими сведениями по данному вопросу мы не располагаем, и этот пробел отражает общий низкий уровень наших знаний о нуклеопротеидах вообще. Как правило, связь нуклеиновой кислоты с белком в вирусных частицах значительно прочнее, чем в тканевых нуклеопротеидах. Повышенная прочность нуклеопротеидных связей в вирусном корпускуле, разумеется, не означает наличия между белком и нуклеиновой кислотой ковалентных связей.

Скорее всего, нуклеиновую кислоту и белок в вирусном корпускуле связывают обычные солевые связи. В силу очень тесного стерического взаимоотношения между нуклеиновой кислотой и белком в вирусном корпускуле солевые связи должны быть, с одной стороны, более многочисленными, а с другой — более прочными. Кроме того, пространственная совместимость этих

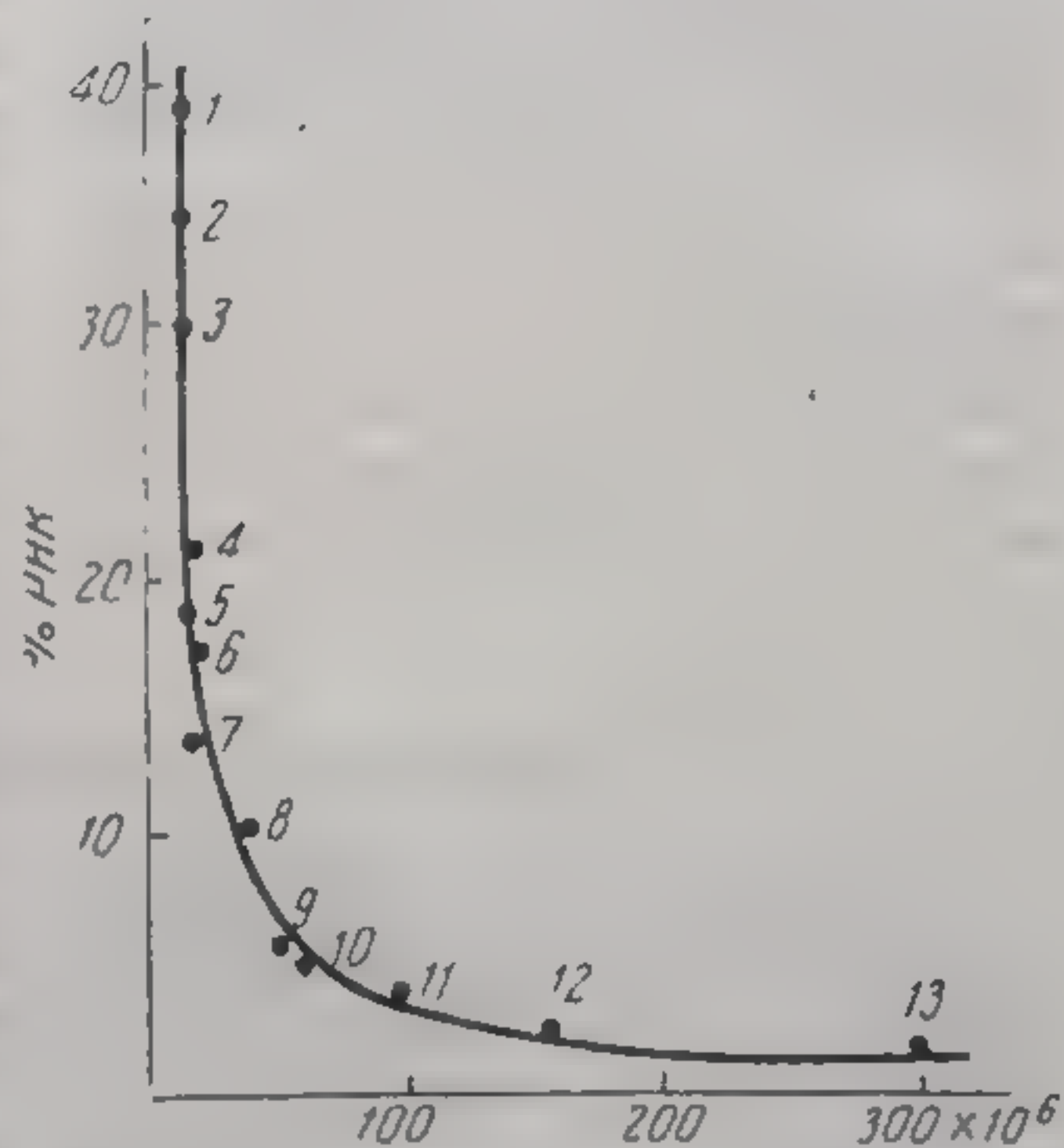


Рис. 1. Зависимость между содержанием РНК и молекулярным весом вируса.

1 — вирус кольцевой пятнистости табака; 2 — вирус желтой мозаики турнепса; 3 — вирус полиомиелита; 4 — вирус южной мозаики фасоли; 5 — вирус некроза табака; 6 — вирус карликовой кустистости томатов; 7 — вирус мозаики люцерны; 8 — вирус энцефалита лошадей; 9 — Х-вирус картофеля; 10 — вирус табачной мозаики; 11 — У-вирус картофеля; 12 — вирус чумы птиц; 13 — вирус гриппа.

компонентов может приводить к образованию большого количества дополнительных связующих сил типа водородных связей и ван дер Ваальсовых сил взаимодействия. Немалую роль играют также и сплы, связывающие белковые субъединицы, поскольку вирусный корпускул представляет собой снаружи белковый чехол, надетый на нуклеиновую кислоту таким образом, что разрыв между «чехлом» (белком) и его «содержимым» (РНК или ДНК) обычно наступает лишь после разрыва самой белковой оболочки. В пользу существования солевых связей между нуклеиновой кислотой и белком свидетельствуют опыты по связыванию красок ВТМ до и после удаления из него РНК. По данным Кауше, ВТМ связывает такое количество кислой краски, которое эквивалентно 14 000 основных групп на моль вируса и такое количество основной краски, которое эквивалентно 45 000 кислых групп на моль вируса. Очищенный препарат вирусного белка, обладая таким же количеством кислых групп, содержит около 25 000 основных групп на моль, т. е. отличается от нормального вируса наличием 11 000 лишних основных групп. Поскольку РНК ВТМ содержит около 12 000 кислых групп, то удаление РНК хорошо объясняет появление новых основных групп в белковом компоненте. Так как преобладающей основной аминокислотой в ВТМ является аргинин, то, по-видимому, РНК связана с белком в основном за счет гуанидиновых групп аргинина.

Некоторые исследователи [123] указывают на возможную роль ионов металлов в образовании связей между нуклеиновой кислотой и белком в частицах некоторых вирусов. Уотсон, в частности, утверждает, что отрицательные заряды отдельных группировок ДНК не могут быть нейтрализованы основными аминокислотами фагового белка и на этом основании считает возможным существование ДНК фага в виде соли какого-либо металла. Удаление значительной части Са, Си и Mg в результате диализа против 0,5% этилендиаминтетраацетата приводит к значительному снижению инфекционности. Лоринг и соавторы [87,88] допускают, что значительная часть по крайней мере железа и магния связана не с белком, а с РНК, однако убедительных доказательств в пользу такой точки зрения не приводят.

Одной из возможных связей между нуклеиновой кислотой и белком в вирусной частице долгое время считали фосфотриэстерную связь между фосфатом РНК и гидроксилами белка. Однако, по последним данным Косланда [124], денатурация ВТМ нагреванием или алкилсульфатами в присутствии H_2O^{18} не сопровождается включением изотопа в нуклеотиды РНК, что говорит против наличия третичных фосфатных эфиров по крайней мере у ВТМ.

в) Структурные субъединицы в вирусных частицах

Изучение структуры вирусов получило дальнейшее развитие в работах группы немецких исследователей во главе со Шраммом, который еще в 1947 г. установил факт щелочной деградации ВТМ до белковых субъединиц и свободной РНК [125]. Тогда же им было показано, что продукты щелочного распада белка ВТМ при подкислении среды самопроизвольно агрегируют в палочковидные образования, сходные по своей морфологии с вирусными частицами. Более детальное исследование распада вирусного белка и реагрегации продуктов распада, произведенное Шраммом с сотрудниками в 1955 г. [20, 113, 126, 127], позволило выявить ряд закономерностей этих процессов и подтвердить, что палочковидные структуры, образующиеся в результате реагрегации, ни серологически, ни по физико-химическим свойствам не отличаются от нативного ВТМ, хотя и не обладают инфекционностью. Согласно представлениям Шрамма, щелочная деградация вируса протекает следующим образом: в зоне рН 9,2—10,5 от вирусной частицы отщепляются

обломками можно различить центрально расположенную нить, образованную, по мнению автора, РНК. Интересно отметить, что распад вируса кактуса в противоположность ВТМ и полиэдрическому вирусу *Araricia eratoegi* происходит в слабокислой зоне рН, тогда как при рН 9,6 частица вируса кактуса стабильна. Факты, сообщаемые Кригом и Амелунксеном, весьма любопытны, поскольку эти вирусы принадлежат к очень далеким друг от друга биологическим группам и содержат разные типы нуклеиновых кислот (РНК у вируса кактуса и ВТМ и ДНК у полиэдрического вируса).

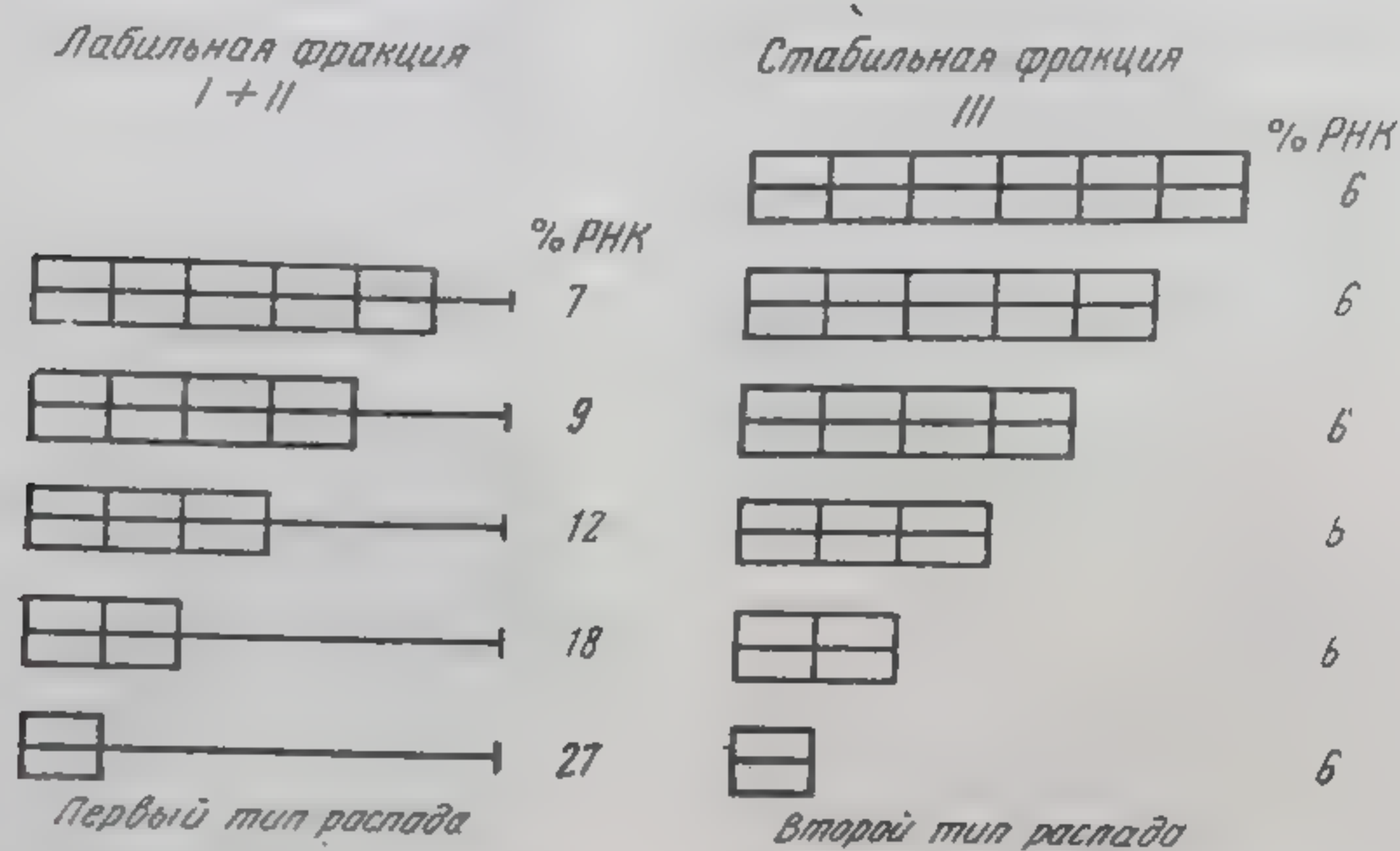


Рис. 3. Схема распада вируса табачной мозаики по Шрамму.

Изучение щелочной деградации белковых оболочек бактериофага Т2, приведенное Ван-Бунакис [34], обнаружило более сложную картину строения фагового корпускула по сравнению с ВТМ. Щелочная деградация фагового белка проходила через ряд промежуточных стадий, определяющихся по величинам молекулярного веса в ультрацентрифуге, но кинетика образования этих субъединиц не изучалась; хотя количество N-концевых и С-концевых аминокислот после щелочной деградации не изменялось, способность продуктов распада к блокированию антифаговой сыворотки резко сокращалась, что свидетельствует, вероятно, о денатурационных изменениях белка. На основании данных Ван-Бунакис трудно решить, в каких структурных взаимоотношениях находятся эти субъединицы (представляющие пептидные цепочки) с промежуточными продуктами распада, образующимися при щелочной деградации. Неясно, являются ли эти промежуточные продукты с постепенно убывающими молекулярными весами стабильными субъединицами, реально существующими в фаговом корпускуле.

О существовании белковых субъединиц в частицах вируса полиомиелита свидетельствуют опыты Эренберга [130], установившего, что дезинтеграция инфекционных частиц при лиофилизации сопровождается их распадом на более низкомолекулярные компоненты с константой седиментации 60—69 S и 15 S с одновременной потерей инфекционности. Что представляют собой эти компоненты, столь различающиеся по молекулярному весу, автор не объясняет. Судя по тому, что в этих компонентах обнаруживается не весь белок препарата, можно предположить, что распад вируса полиомиелита при лиофилизации заходит значительно дальше, т. е. до более низкомолекулярных соединений, не осаждающихся в ультрацентрифуге.

г) Ресинтез вируса табачной мозаики

А-белок, выделенный из продуктов распада электрофоретически или дробным высаливанием сульфатом аммония, стабилен лишь в сильно щелочной зоне рН. В слабо щелочной, нейтральной или кислой зонах рН А-белок самопроизвольно агрегирует в описанные уже дискообразные единицы с центральным отверстием. Белковые диски являются достаточно стабильными образованиями и их агрегация в вирусоподобные частицы происходит лишь в кислой зоне рН. Образование вирусоподобных частиц в результате агрегации молекул А-белка в противоположность процессу щелочной деградации происходит непосредственно без образования промежуточных соединений.

Неинфекционные палочковидные частицы, образовавшиеся в результате агрегации молекул А-белка, морфологически сходны с нативным ВТМ, за исключением большего разнообразия в длине. Антисыворотка к препаратам того штамма ВТМ, из которого выделялся А-белок, полностью осаждает эти вирусоподобные частицы и, наоборот, антисыворотка к продуктам агрегации А-белка полностью нейтрализует инфекционные вирусные препараты. При электрофорезе вирусоподобные частицы мигрируют со скоростью, аналогичной электрофоретической подвижности исходного вируса, причем продукты агрегации А-белка различных штаммов перемещаются со скоростью, характерной для вирусных частиц данных штаммов. Рентгеновские спектры нормальных вирусных корпускул и вирусоподобных частиц, как упоминалось выше, очень сходны; отличаются они лишь наличием максимума поглощения, обусловленного РНК, у нормального ВТМ. Вторым существенным отличием (подробнее см. ниже) является меньшая стойкость продуктов агрегации А-белка к воздействиям внешней среды.

Замечательной особенностью щелочной деградации ВТМ и последующей реагрегации продуктов распада в вирусоподобные частицы является то, что эти процессы представляют собой чисто химические реакции с ярко выраженной зависимостью от концентрации веществ, рН среды, температуры и времени. Особенно интересен тот факт, что в результате подобной химической реакции (агрегации) синтезируются вещества, обладающие высокой иммунобиологической специфичностью и морфологической структурой. Разумеется, эти опыты нельзя трактовать как синтез специфических высокомолекулярных белков из неспецифических элементов (аминокислот), поскольку исходным продуктом являются пептидные цепочки. Однако результаты этих исследований несомненно займут должное место в познании закономерностей живых систем и прежде всего одного из их субстратов — белка.

Синтез биологически активных вирусных частиц из неинфекционных материалов — белка и нуклеиновой кислоты — осуществлен впервые Френкель-Конратом [131] в 1955 г. В том же году, но несколькими месяцами позже Шрамм [20, 113] также опубликовал предварительное сообщение о синтезе инфекционного нуклеопротеида из смеси белка и РНК. В смеси растворов белка и нуклеиновой кислоты (10 частей белка на одну часть нуклеиновой кислоты) при рН 6,0 шла не просто агрегация А-белка в вирусоподобные частицы, а образование нуклеопротеида с типичным для ВТМ спектром поглощения в ультрафиолете. Препарат ресинтезированного ВТМ в концентрации 10—1000 мг/мл обладал инфекционностью, равной инфекционности нативного вируса в концентрации 0,1 мг/мл, т. е. происходило восстановление (реконструкция) 0,1% нормальных вирусных частиц. Вскоре результаты этих двух исследований были подтверждены серией работ других лабораторий, устранивших возможность объяснения этих данных

за счет неразрушенного вируса. В свете данных Френкель-Конрата [22, 132], которому в присутствии пирофосфата и некоторых металлов удалось повысить выход реконструированных вирусных частиц до 30—50% исходной активности, всякие сомнения в истинности реконструкции, очевидно, отпадают. Выход 30—50% инфекционных частиц в опытах по реконструкции невозможно уже объяснить примесью неразрушенных вирусных частиц или наличием каких-либо ингибиторов, удаляемых сульфатом аммония. Конечные продукты реконструкции гетерогенны по размерам, содержанию РНК, инфекционности и строению белковой оболочки.

Вместо гомологичной вирусной РНК в реакционную смесь можно ввести дрожжевую РНК или искусственные полирибонуклеотиды [119, 120], так что при последующем подкислении среды будут образовываться нуклеопротениды, содержащие 4—6% чужеродной нуклеиновой кислоты или синтетического полирибонуклеотида, не обладающие инфекционностью, но по внешнему виду неотличимые от нативного вируса. В отличие от вирусоподобных агрегатов А-белка реконструированные частицы, содержащие естественную гомологичную или гетерологичную РНК или синтетические полирибонуклеотиды, обладают значительно более высокой устойчивостью к ряду внешних воздействий. Палочковидные частицы, образовавшиеся в результате агрегации только А-белка (без участия РНК), не выдерживают диализа или легкого нагревания, распадаясь на дископодобные образования с центральным отверстием, тогда как реконструированные вирусные частицы сохраняют при диализе или умеренных термических воздействиях свою структурную и морфологическую интактность. Кроме того, Френкель-Конрату [132] удалось наблюдать реконституцию так называемых смешанных вирусов, в которых инфекционные частицы получали путем соединения белка и РНК, взятых от различных штаммов ВТМ. Комбинируя белок и РНК типичного, маскированного, НР и АУ штаммов, Френкель-Конрат получил семь новых типов смешанных вирусов, обладающих инфекционностью и состоящих из комбинации различных белков и РНК.

Инфекционность таких восстановленных вирусных частиц специфически подавлялась антисыворотками только к тому штамму, который служил донором белка; антитела к штамму, служившему источником РНК, с такими вирусными частицами не реагировали. Симптомы заболевания, вызываемые на растениях «смешанными вирусами», были сходны с симптомами, вызываемыми штаммами — донорами РНК. Потомства «смешанных вирусов» также были характерны для вирусов, являющихся источником РНК. Эти опыты представляют собой ярчайшие доказательства биологической активности нуклеиновых кислот, поскольку весь белковый компонент таких смешанных частиц принадлежит другому штамму, свойства которого не проявляются ни в симптомах заболевания, ни в наследственности. Все эти свойства определяются исключительно нуклеиновой кислотой вирусных частиц.

д) Гипотезы относительно структуры некоторых вирусов

Частицы ВТМ представляют собой нуклеопротенид цилиндрической формы диаметром около 150 Å и длиной около 3000 Å. Белковый компонент вируса построен из спирально расположенных субъединиц [133] (пептидных цепочек) с молекулярным весом 18 000, что соответствует молекулярному весу вируса (включая РНК) 40—50 млн. Изучение дифракции рентгеновых лучей, произведенное Франклин [122, 134, 135], показало, что эти субъ-

единицы расположены таким образом, что образуют на внешней поверхности частицы паз и гребень, направление которых совпадает с направлением главной спирали. Паз—сплошное образование, имеющее глубину 30 Å и форму, которая обеспечивает максимальное сцепление параллельно расположенных вирусных частиц. Гребень, ограничивающий паз, не является сплошным образованием, а состоит из выступов, правильно повторяющихся по ходу спирали, причем каждый выступ соответствует одной белковой субъединице. Такая структура вирусной частицы вдвое увеличивает ее поверхность по сравнению с площадью гладкого цилиндра того же диаметра. Особый интерес представляет главная спираль, определяющая как внешний рельеф, так и внутреннюю структуру частицы. Шаг спирали, выявленный рентгеноструктурным анализом, составляет 23 Å, период идентичности (три оборота спирали) равен 69 Å, что соответствует приблизительно 130 виткам во всей спирали. Исследуя рассеяния лучей Рентгена нормальными частицами ВТМ и частицами, в которых цистеиновые остатки связаны с атомами ртути, Франклин [134—136] пришла к выводу, что в трех оборотах спирали содержится 49 структурных субъединиц (а не 31 или 37, как считали ранее). Таким образом, во всей вирусной частице содержится 2130 белковых субъединиц (по количеству С-концевых аминокислот в ВТМ содержится 2900 ± 100 белковых субъединиц).

В связи с обсуждением вопроса о локализации нуклеиновой кислоты в вирусных корпускулах указывалось, что, по данным рентгеноструктурного анализа, внутри частиц ВТМ имеется внутренняя полость около 38 Å в диаметре. Спираль РНК не образует центральной оси частицы, а глубоко погружена в белок таким образом, что от центральной полости ее отделяет расстояние 16—15 Å, а от внешней поверхности частицы — расстояние около 70 Å. Такая картина внутренней структуры, созданная на основе рентгеноструктурного анализа [118, 134—137], подтверждается прямыми наблюдениями Фернандес-Морана. На представленных им электронографиях продольных и поперечных срезов частиц ВТМ отчетливо различим центральный канал с диаметром 30—40 Å. Уранил-ацетат и нитрат лантана, являющиеся специфическими электрономикроскопическими красителями для нуклеиновой кислоты, отлагаются на расстоянии 40 Å по обе стороны от длинной оси частицы, т. е. там, где, по данным рентгеноструктурного анализа, проходит спираль РНК.

Какое же место в такой структуре занимают описанные Шраммом субъединицы — дископодобные образования с центральным отверстием, А-белок и др.? Шрамм считает, что дископодобные образования соответствуют участку вирусной частицы, заключенному между 3 витками спирали (период идентичности), и состоят из 8 молекул А-белка, построенных в свою очередь из 6 пептидных цепочек. Схематическое изображение такой структуры представлено на рис. 6.

Идеальное совпадение между величиной периода идентичности спирали (69 Å), определенной рентгеноскопически, и высотой дисков (70 Å), измеренной в электронном микроскопе, позволяет думать, что схема Шрамма, дополняющая данные Франклин, в основной своей части соответствует действительности. Однако между представлением о структуре ВТМ, созданным на основе биохимических исследований, и схемой, составленной в результате изучения рентгеновских спектров вируса, имеются некоторые несоответствия. Диаметр центрального отверстия дископодобных образований, по данным электронной микроскопии, составляет 50 Å, тогда как диаметр полого канала в нативном вирусе, определенный рентгеноскопически, равен 37 Å. Создается впечатление, что какая-то часть белкового компонента, ограничивающая этот внутренний канал и расположенная, по данным рентгеноструктурного анализа, на расстоянии 24—25 Å (по радиусу) от

центральной оси частицы, при щелочной деградации теряется, что и вызывает увеличение диаметра центрального отверстия в дископодобных образованиях. Косвенным свидетельством в пользу такого предположения является

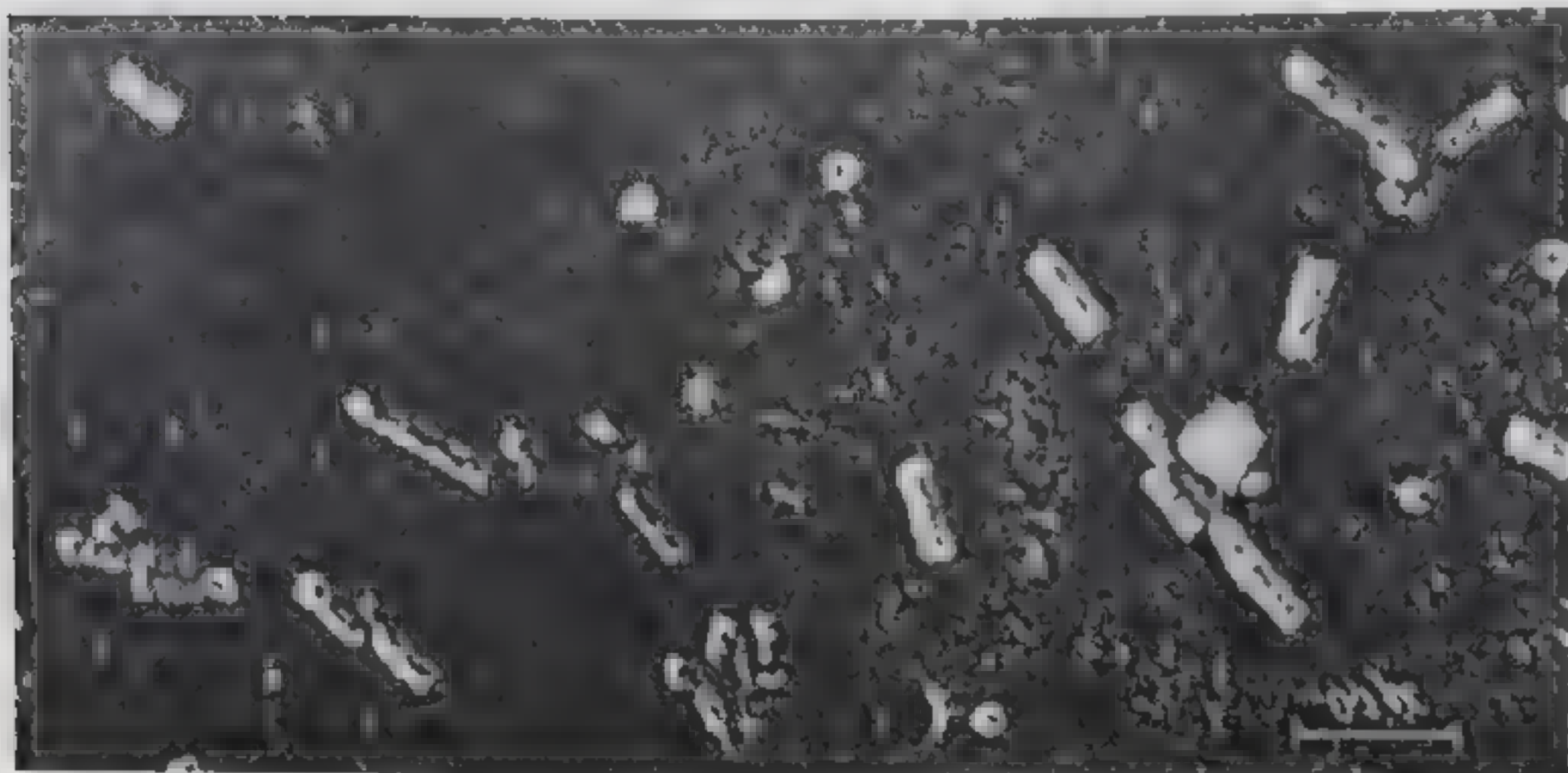


Рис. 4. Электронография продуктов щелочной деградации вируса табачной мозаики. Видны нити свободной РНК, дископодобные и палочковидные субъединицы белка. Увеличение 150 000.

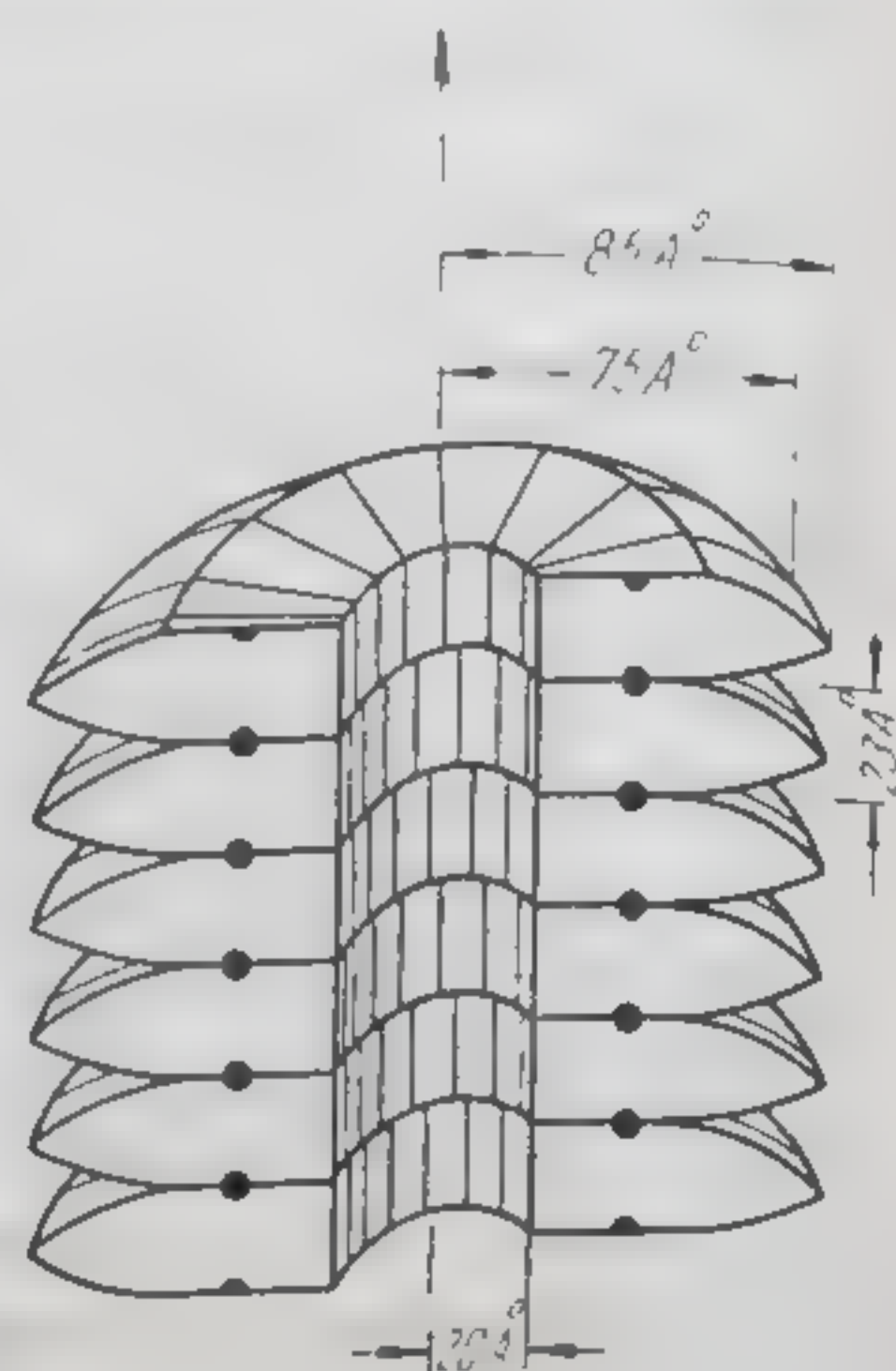


Рис. 5. Схематическое изображение структуры вируса табачной мозаики по Шрамму и Франклин.

ся несоответствие между количеством пептидных цепочек, определяемых химическими методами, и числом субъединиц, установленным с помощью физических методов исследования. Возможно, однако, что причиной отмеченного несоответствия являются какие-то другие, еще неизвестные особенности структуры ВТМ или, может

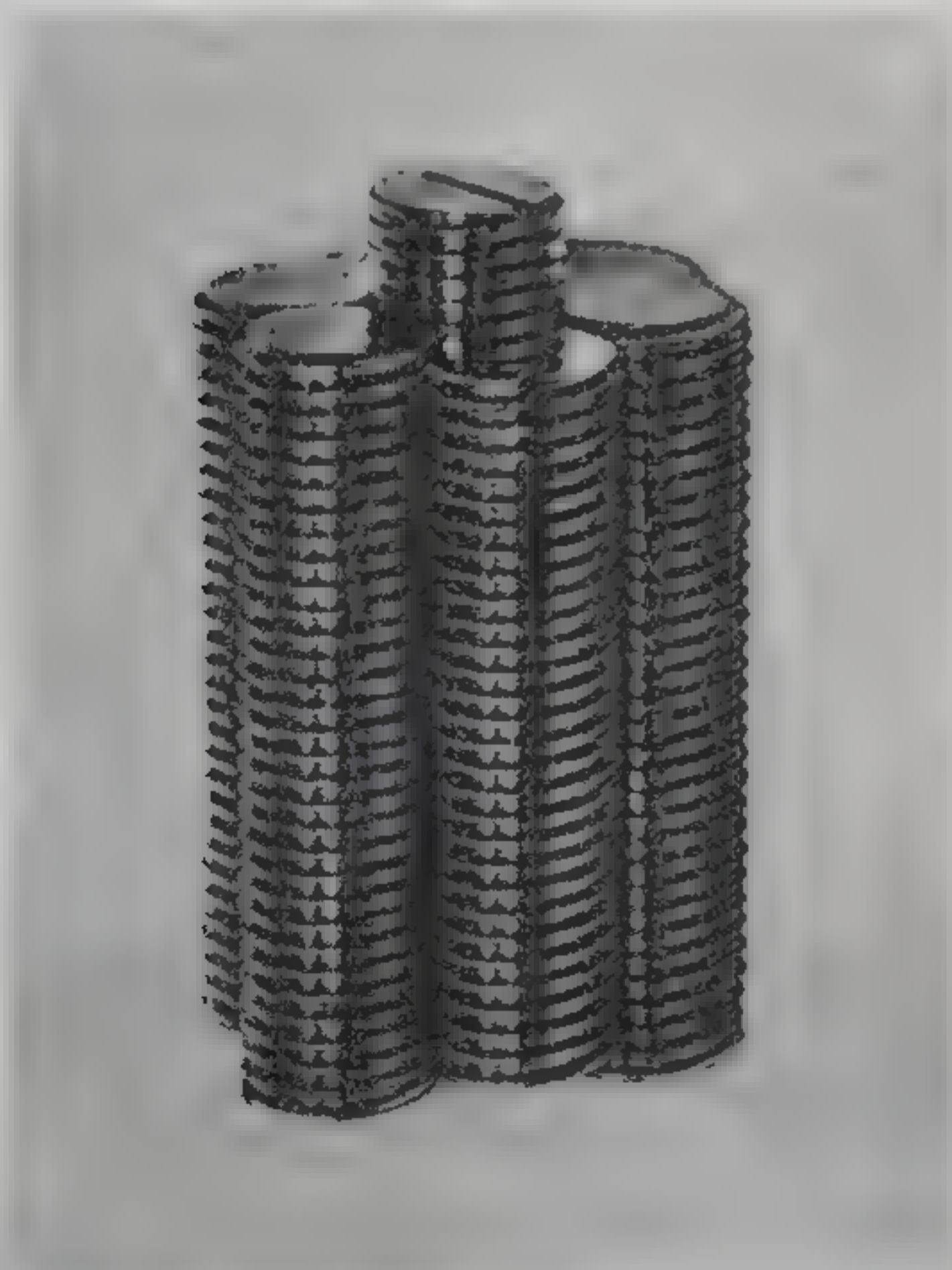


Рис. 6. Схематическое изображение поверхности вируса табачной мозаики по Франклин. Семь вирусных частиц расположены по способу наиболее плотной упаковки.

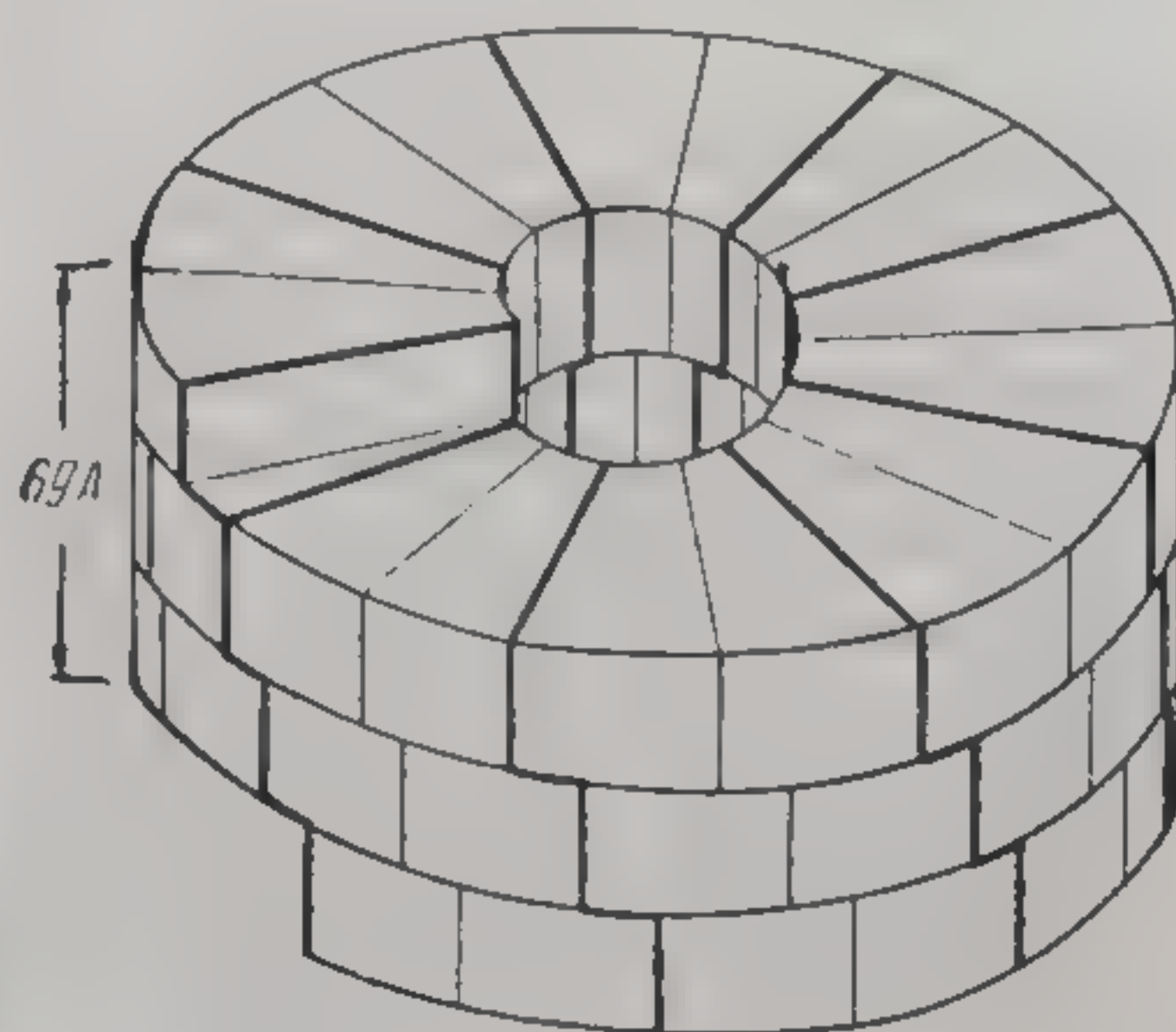


Рис. 7. Схематическое изображение структуры дископодобных субъединиц в вирусе табачной мозаики по Шрамму.

быть, методические погрешности. Сходной структурой обладает также вирус кактусов [129].

Из вирусов животных схемы структур были предложены для вируса болезни Ньюкастл, вируса классической чумы птиц и вируса осповакцины. Первые два принадлежат к группе средних по величине сферических вирусов, третий — к группе крупных, квадратных по форме вирусов.

Вирус классической чумы птиц, интенсивно исследовавшийся Шефером [45,46], принадлежит к группе вирусов гриппа. Вирусные частицы обладают формой, близкой к сферической с диаметром 70—80 мк. Как и вирус болезни Ньюкастл, вирус классической чумы птиц наряду с инфекцион-

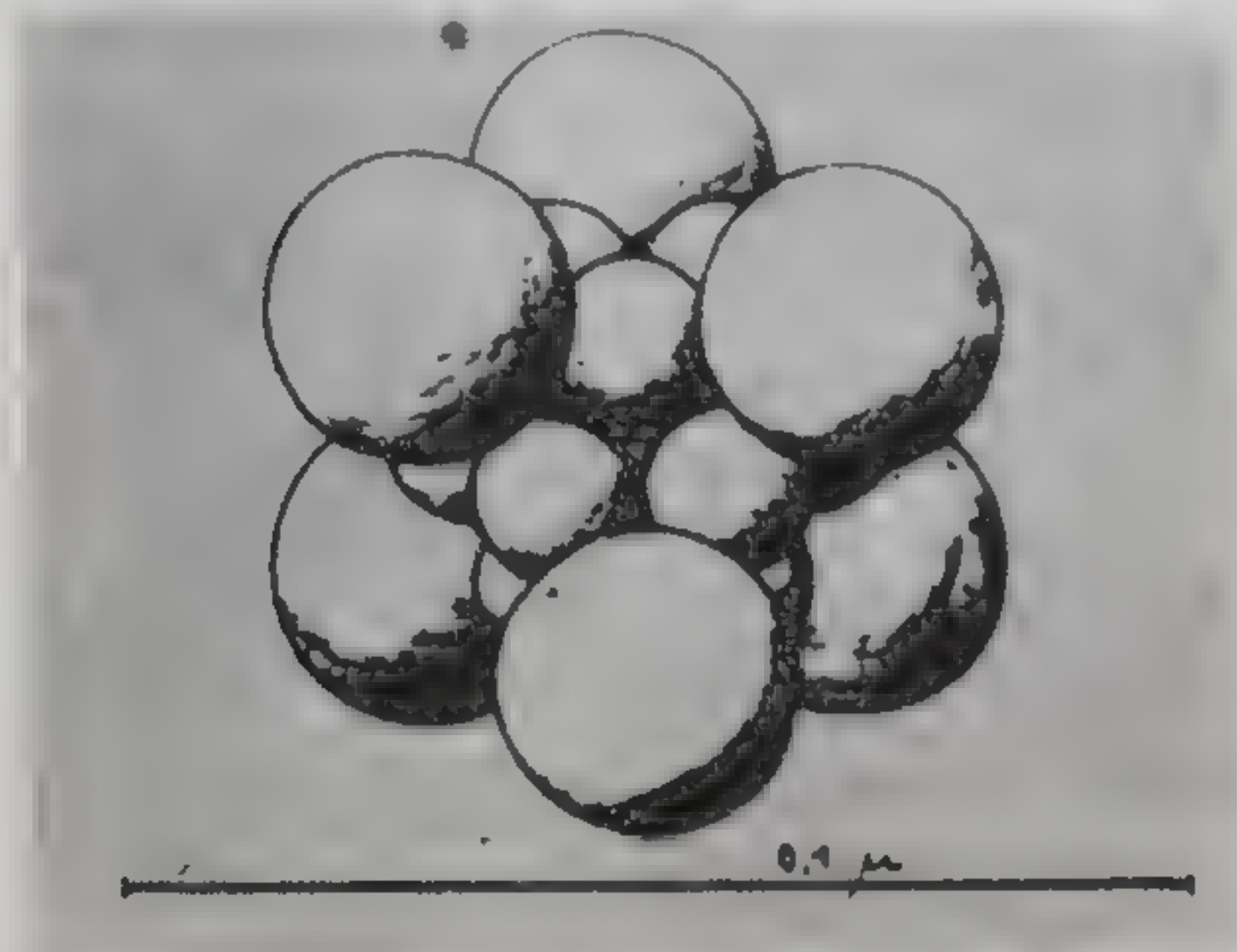


Рис. 8. Схематическое изображение вируса классической чумы птиц по Шеферу.

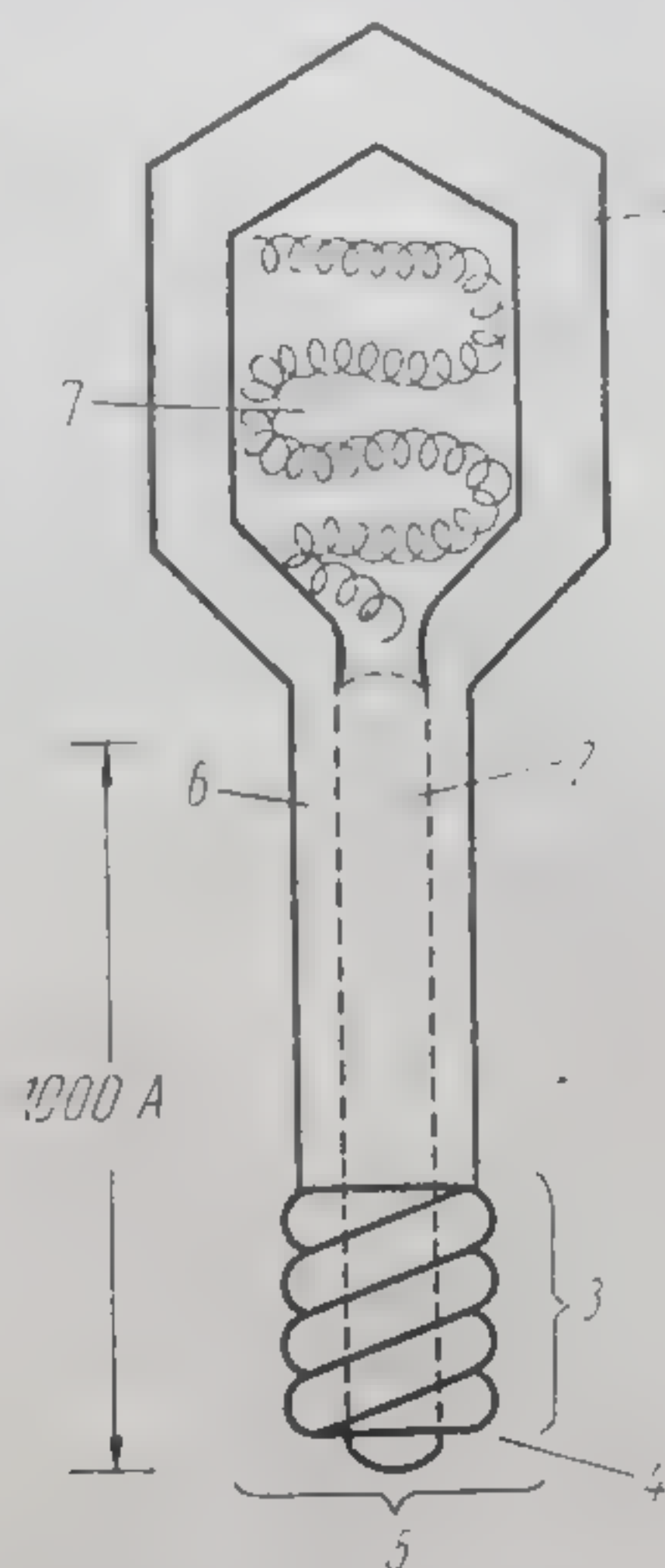


Рис. 9. Схематическое изображение структуры бактериофага T_2 согласно представлениям Андерсона—Козлова.

1 — оболочка головки; 2 — стержень хвоста; 3 — нити, прикрепленные тиоэфирными связями к стержню; 4 — структуры, контролируемые h-локусом; 5 — место прикрепления к клетке хозяина; 6 — проксимальная часть хвоста; 7 — ДНК.

ностью обладает также и гемагглютинирующей активностью, т. е. является морфологически и функционально более сложным образованием, чем рассмотренные выше просто организованные вирусы растений. Морфологическая и функциональная сложность вируса находит свое выражение и в сложности химического состава его частиц, в которых наряду с белком и нуклеиновой кислотой (РНК) обнаруживаются также липиды и углеводы. По представлениям Шефера, внутри вируса находятся дискретные частицы «связанных антигенов» диаметром 10—15 мк. По данным химического анализа, эти частицы состоят на 85—90% из белка и на 10—15% из РНК, т. е. содержат всю РНК вируса. Связь РНК с белком в нуклеопротеиде связанного антигена относительно слаба, в силу чего нуклеиновая кислота чувствительна к действию рибонуклеазы, хотя не исключена возможность, что ослабление нуклеопротеидных связей обусловливается денатурационными изменениями частиц антигена при его выделении. Вторым компонентом ви-

русного корпускула являются гемагглютнинины, представляющие собой сферические частицы диаметром около 30 мμ.

В гемагглютнининах сосредоточена вся ферментативная активность вируса. Согласно данным химического анализа, они содержат только белок и углеводы. Поскольку липиды, имеющиеся в большом количестве в нативном вирусе, не обнаруживаются ни в «связанных антигенах», ни в составе гемагглютнининов, а обработка липондным растворителем (эфиром) вызывает распад вирусного корпускула на эти два компонента, то предполагается, что липиды выполняют лишь роль цементирующего средства, соединяющего «связанные антигены» и гемагглютнинины в вирусную частицу. Очищенные препараты гемагглютнининов и «связанных антигенов» ни порознь, ни в виде смеси инфекционностью не обладают. Следует отметить, что такая схема кажется слишком упрощенной и совершенно игнорирующей ту высокую степень специфичности и строгой координации составных частей в вирусных частицах, с которой мы познакомились на примере растительных вирусов. Кроме того, подобная точка зрения несовместима с хорошо выраженной морфологической определенностью частиц вируса классической чумы птиц и со строгим постоянством его химического состава.

Схема структуры фага Т2 построена на основании многочисленных электронномикроскопических исследований, а также серии химических, биофизических и генетических исследований Андерсона, Херши, Козлова и Бреннера [28, 35, 138, 139]. Бактериофаг принадлежит к числу вирусов, которые в отличие от вирусов растений активно проникают в клетку хозяина, что находит выражение в особенностях высокодифференцированного аппарата, служащего для адсорбции его на клетке и введения в нее элементов, необходимых для репродукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schleisinger M. Biochem Z., 1933, 264, 6—12.
2. Schleisinger M. Nature, 1936, 138, 3480, 508—509.
3. Stanley W. W. Science, 1935, 81, 2113, 644—645.
4. Bawden F. C., Pirie N. W. Brit. J. Exper. Path., 1937, 18, 275—290.
5. Bawden F. C., Pirie N. W., Brit. J. Exper. Path., 1938, 19, 1, 66—82.
6. Рыжков В. Л., Громыко Е. П. Доклады АН СССР, 1938, 19, 3, 203—205.
7. Товарницкий В. И. Биохимия, 1945, 10, 104—116.
8. Товарницкий В. И. Новости медицины, 1947, 4, 5—20.
9. Schramm G. Biochim. Viren. Berlin, 1954.
10. Ross A. J. Biol. Chem., 1942, 143, 685—695.
11. Knight C. Advances in Virus Res., 1954, 2, 153.
12. Aach H. G. Z. Naturforsch., 1958, 13b, 2, 425—433.
13. De Fremery D., Knight C. A. J. Biol. Chem., 1955, 214, 559—566.
14. Wittman H. G. Z. Vererbungslehre, 1959, 90, 4, 463—475.
15. Knight C. J. Biol. Chem., 1955, 214/231—237.
16. Harris J., Knight C. Nature, 1952, 170, 613.
17. Harris J., Knight C. J. Biol. Chem., 1955, 214/215—230.
18. Hashenmeyer R., Singer R., Fraenkel-Conrat H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1959, 45, 313—319.
19. Ramachandram L. K. Virology, 1958, 5, 244—255.
20. Schramm G., Zillig W. Z. Naturforsch., 1955, 10b, 9, 493—499.
21. Auswin A. T., Lauffer M. A. Nature, 1959, 183, 4675, 1601—1602.
22. Fraenkel-Conrat H., Singer B. J. Amer. Chem. Soc., 1954, 76, 180—183.
23. Anderer F. A. Z. Naturforsch., 1959, 14b, 6, 363—369.
24. Anderer F. A. Z. Naturforsch., 1959, 14b, 1, 24—28.
25. Braunitzer G. Biochem. Biophys. Acta, 1956, 10, 574—575.
26. Narita K. Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31, 372—377.
27. Anderer F. A., Weber E., Uhlig H. Z. Naturforsch., 1960, 15b, 2, 79—85.
28. Anderson T. F. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1953, 18, 197—203.
29. Tsugita A. Biochim. Biophys. Acta, 1960, 38, 145—146.
30. Tsugita A., Gish D. T., Young J., Fraenkel-Conrat H., Knight C. A., Stanley W. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1960, 46, 1463—1469.
31. Niu Ching I., Shore V., Knight C. Virology, 1958, 6, 226—233.

32. Van Vunakis H., Barlow J. L., Levine L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1956, 42, 391—394.
33. Van Vunakis H., Barlow J. L., Leikhim E. Ann. Rept. Div. Labs. and Res. N. Y. State Dept. Health., 1956, 59—71.
34. Van Vunakis H., Baker W. H., Brown R. K. Virology, 1958, 5, 327—336.
35. Brenner S., Streosinger G., Horne R. W., Champes S. P., Barnett L., Benzer S., Ress M. W. J. Molec. Biol., 1959, 1, 3, 281—292.
36. Ching I. Niu, Fraenkel-Conrat H. Arch. Biochem. Biophys., 1955, 59, 533—543.
37. Найт К. А. Природа вирусов. И. Л., Москва, 1958.
38. Kleszkowski A. J. Gen. Microb., 1957, 16, 405—417.
39. Тихоненко А. С., Куимова Т. Ф. Микробиология, 1960, 29, 395—400.
40. Peters D. Nature, 1956, 178, 4548, 1453—1455.
41. Peters D. Z. Naturforsch. 12b, 11, 697—715.
42. Levine L., Barlow J. L., Van Vunakis H. Virology, 1958, 6, 702—717.
43. Murukami M. T., Van Vunakis H., Levine L. Virology, 1959, 9, 624—635.
44. Hoyle Z. J. Hygiene, 1952, 50, 229, 245.
45. Schäfer W. Nova Acta Leopoldina, 1957, 19, 134, 38—54.
46. Schäfer W., Zillig W. Z. Naturforsch., 1954, 9b, 779—788.
47. Wilson D. Radiat. Res., 1958, 8, 142—149.
48. Zillig W., Schäfer W., Ullman S. Z. Naturforsch., 1955, 10b, 4, 199—206.
49. Volkin E., Astrachan L. Virology, 1956, 2, 594—598.
50. Sinsheimer R. L. J. Molec. Biol., 1959, 1, 37—42.
51. Sinsheimer R. L. J. Molec. Biol., 1959, 1, 43—53.
52. Tessman I. Virology, 1959, 9, 375—385.
53. Tessman I. Lab. Invest., 1959, 8, 1, 245—249.
54. Tessman I. Virology, 1959, 7, 263—275.
55. Wyatt G. R. J. Gen. Physiol., 1952, 36, 201—205.
56. Krieg A. Naturwissenschaft, 1956, 43, 537.
57. Krieg A. Z. Naturforsch., 1956, 43, 537.
58. Burke D. C., Isaaks A., Walker J. Biochim. Biophys. Acta, 1957, 26, 576—584.
59. Cohen S. S. J. Immunol., 1950, 65, 475—483.
60. Cohn Z. A., Hahn F. F., Ceglowski W., Bozeman F. M. Science, 1958, 127, 3293, 232—233.
61. Black L. M. Advances in Virus Res., 1953, 1, 69—90.
62. Frish-Niggemeyer W. Nature, 1956, 178, 4528, 307—308.
63. Paul H. L. Z. Naturforsch., 1959, 14b, 432—433.
64. Dunn D. B., Smith J. D. Nature, 1954, 174, 4424, 305—307.
65. Gordon M., Staehelin M. J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 2340—2341.
66. Jeener R. Biochem. Biophys. Acta., 1957, 23, 351—361.
67. Mandel H. G., Markham R., Matthews R. E. T. Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, 205—206.
68. Matthews R. E. F., Nature, 1953, 171, 4363, 1065—1066.
69. McDonald D. L., Knight C. A. J. Biol. Chem., 1953, 202, 45—50.
70. Schwerdt C., Loring H. J. Biol. Chem., 1947, 167, 593—597.
71. Jesaitis M. J. Exptl. Med., 1957, 106, 233—246.
72. Markham R., Smith J. D. Biochem. J., 1950, 47, 513—517.
73. Спирин А. С., Белозерский А. Н. Биохимия, 1956, 21, 768—775.
74. Спирин А. С., Белозерский А. Н., Претель-Мартинес А. Доклады АН СССР, 1958, III/6, 1297—1299.
75. Knight C. J. Biol. Chem., 1952, 197, 241—249.
76. Крик Ф., Уотсон Д. Природа вирусов. И. Л., 1958.
77. Reddi K. K. Biochem. Biophys. Acta, 1957, 25, 528—531.
78. Reddi K. K. J. Biol. Chem., 1956, 221, 629—633.
79. Reichman M. E., Rice S. A., Thomas C. A., Doty P. J. Amer. Chem. Soc. 1954, 76, 3047—3053.
80. Cohen S. S. Advances in Virus Res., 1955, 3, 1, 48.
81. Levinthal G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 1956, 42, 394—404.
82. Thomas C. A., Knight J. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 1959, 45, 332—334.
83. Thomas C. A. J. Gen. Microbiol., 1959, 42, 503—523.
84. Davidson P. F., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1959, 45, 1560—1563.
85. Hershey A. D., Burgi E. J. Molec. Biol., 1960, 2, 143—152.
86. Boedtker H. Biochem. Biophys. Acta, 1959, 32, 2, 519—531.
87. Gierer A. Nature, 1957, 179, 4573, 1297—1299.
88. Ginoza W. Nature, 1958, 181, 4614, 958—961.
89. Hopkins G., Sinsheimer R. Biochem. Biophys. Acta, 1955, 17, 476—484.

90. Loring H. S. Al-Ramis, Fujimoto Y. J. Biol. Chem., 1958, 233, 1415—1420.
91. Peng Cheng Cheo, Friesen B. S., Sinsheimer R. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1959, 45, 305—315.
92. Willkins N. Nature, 1953, 171, 4356, 738—748.
93. Франклин Р., Клер А., Холмс К. Природа вирусов. И. Л.
94. Гаврилова Л. П., Спирин А. С., Белозерский А. Н. Доклады АН СССР, 1959, 126, 1121—1124.
95. Гаврилова Л. П., Спирин А. С. Биохимия, 1959, 24, 503—513.
96. Commoner B., Lippincott J., Shearer G., Richman E., Wu Jia Hsi. Nature, 1956, 178, 4537, 767—771.
97. Loring H. S., Fujimoto Y., Eng L. F. Proc Nat. Acad. Sci. USA, 1959, 45, 287—293.
98. Takahashi W. N., Karler A., Knight C. A. Virology, 1958, 6, 3, 637—648.
99. Armbruster O., Beiss U., Z. Naturforsch, 1958, 13b, 2, 75—79.
100. Frommhaugen Z. H., Freeman N. K., Knight C. A. Virology, 1958, 5, 173—175.
101. Cunha R., Weil M. Z., Beard D., Taylor A. R., Sharp D. E., Beard J. M. J. Immunology, 1947, 55, 69—89.
102. Franklin R., Rubin H., Davis C. A. Virology, 1957, 3, 96—114.
103. Huges T., Parker R., Rivers T. J. Exptl. Med., 1935, 62, 349—352.
104. Smadel J. B., Hoagland C. L. Bacteriol Rev., 1942, 6, 79—110.
105. Knight C. J. Exptl. Med., 1947, 85, 99—116.
106. Putnam F. W. Advances in Protein Chemistry, 1955, 8, 177—284.
107. Laucikowa O., Jakubovic A., Keil B., Sorm F. Geskisl. biol. 1954, 3, 283—291.
108. Loring H. S., Waritz R. S. Science, 1957, 125, 3249, 646—648.
109. Ames B. N., Dubin D. T., Rosental S. M. Science, 1958, 127, 3302, 814—815.
110. Kozloff Z., Lute M. Biochem. Biophys. Acta., 1960, 37, 420—424.
111. Oster E., Grimson H. Arch. Biochem., 1949, 24, 119—130.
112. Fraenkel-Konrat H. J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78, 882—883.
113. Schramm G., Schumacher G., Zillig N. Z. Naturforsch, 1955, 10b, 9, 481—492.
114. Creaser E. H., Taussig H. Virology, 1957, 4, 200—208.
115. Cartwright T. E., Ritchie A. E., Lauffer M. A. Virology, 1956, 2, 689—702.
116. Gierer A., Mundry K. Nature, 1958, 182, 4647, 1457—1458.
117. Mundry K., Gierer A. Z. Vererbungslehre, 1958, 89, 4, 614—630.
118. Fernandez-Moran H., Schramm G. Z. Naturforsch, 1958, 13b, 2, 68—71.
119. Hart R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1955, 41, 261—264.
120. Hart R., Smith J. Nature, 1956, 178, 4536, 739—740.
121. Watson J. D. Biochem. Biophys. Acta., 1954, 13, 10—19.
122. Franklin R. Nature, 1955, 175, 379—381.
123. Уотсон И. Природа размножения вирусов. М., 1956, И. Л.
124. Koshland D., Simmons N., Watson J. J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 105—107.
125. Schramm G. Z. Naturforsch, 1947, 2b, 7—8, 249—257.
126. Schramm G., Braunitzer G., Schneider J. W. Nature, 1955, 176, 4479, 456—457.
127. Schramm G., Schumacher G., Zillig W. Nature, 1955, 175, 4456, 549—550.
128. Krieg A. Z. Naturforsch, 1957, 12b, 2, 120—121.
129. Amelunksen F. Protoplasma, 1958, XLIX, 140—178.
130. Ehrerberg A., Polson A. Biochem. Biophys. Acta, 1958, 28, 2, 442—444.
131. Fraenkel-Konrat H., Williams R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1955, 41, 690—698.
132. Fraenkel-Konrat H., Singe B. Biochem. Biophys. Acta., 1957, 24, 540—548.
133. Сухов К. С., Никифоров Г. С. Доклады АН СССР, 1953, 90, 671—680.
134. Franklin R. E., Holms K. S. Biochem. Biophys. Acta., 1956, 21, 405—406.
135. Franklin R., Klug A. Biochem. Biophys. Acta., 1956, 19, 403—416.
136. Franklin R. Nature, 1956, 177, 4616, 928—930.
137. Caspar D. Nature, 1956, 177, 4516, 928.
138. Hershey A. J. Gen. Phys., 1952, 36, 39—56.
139. Kozloff Z. Intern. Congress Biochem. Viena, 1958, symp. 7, 185—190.

Г Л А В А V

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОСИНТЕЗЕ АНТИТЕЛ

А. Е. Гурвич

ВВЕДЕНИЕ

Изучение процесса образования антител привлекает все большее внимание не только иммунологов, но и биохимиков.

Многочисленные опыты ряда исследователей, начиная с классических опытов К. Ландштейнера [1] по изучению действия искусственных антигенов, полученных комплексированием молекул белка с различными низкомолекулярными соединениями, показали, что специфичность комплексированного антигена может определяться лишь небольшой присоединенной к белку группой. К. Ландштейнеру и другим исследователям удалось получить антитела, специфически реагирующие с отдельными пептидами, углеводами (в том числе и моносахаридами), ароматическими соединениями и многими другими веществами [1, 2, 3, 4, 5].

В ряде случаев было показано, что антигенная специфичность зависит от положения одного радикала в ароматическом ядре. Так, например, антитела, образовавшиеся при иммунизации животного комплексом, содержащим п-амино-м-толуиловую кислоту, не реагируют с п-амино-о-толуиловой кислотой, хотя эти соединения различаются между собой лишь положением метильной группы в ароматическом ядре (табл. 1).

Таблица 1

Зависимость между строением вещества и его способностью
реагировать с иммунными сыворотками против конъюгированных антигенов

Антиген Иммунная сыворотка против	Анилин	о-аминобензойная кислота	п-амино-м-толуиловая кислота	м-аминобензойная кислота	п-амино-о-толуиловая кислота	3-амино-о-метилбензойная кислота	4-хлор-3-аминобензойная кислота	4-бром-3-аминобензойная кислота
Анилин	+++	0	0	0	0	0	0	0
о-аминобензойная кислота	0	+++	++	0	0	0	0	0
м-аминобензойная кислота	0	0	0	++++	0	0	0	0
4-метил-3-аминобензойная кислота	0	0	0	0	0	++	+±	±
4-хлор-3-аминобензойная кислота	0	0	0	+++	0	+++	++++	++++
4-бром-3-аминобензойная кислота	0	0	0	0	0	±	+++	++

Антитела, возникшие при иммунизации комплексом белок- β -галактоза, реагируют лишь с β -галактозой, но не с β -глюкозой, хотя различие между этими соединениями состоит исключительно в пространственном положении гидроксила 4 [2] (рис. 1).

В настоящий момент нет сомнений в том, что и в естественных антигенах специфичность определяется не всей молекулой, а лишь относительно небольшими детерминирующими группами, состоящими из 3—4 аминокислотных остатков, моно- или дисахаридов или каких-либо других соединений [2, 6, 7, 8, 9].

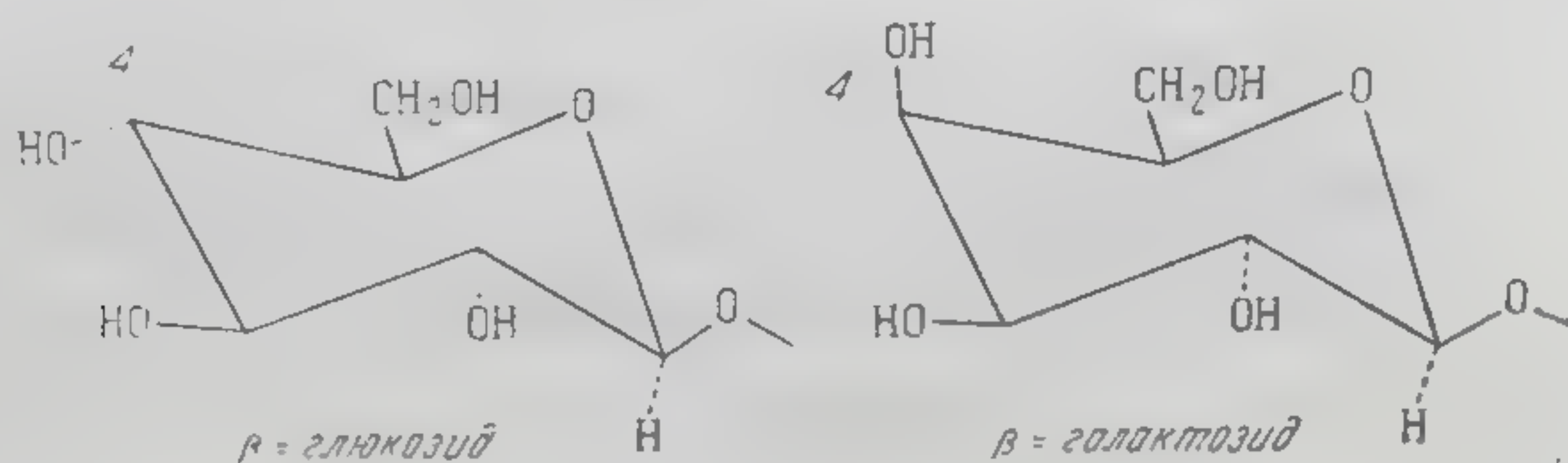


Рис. 1. Структура β -галактозида и β -глюкозида.

Специфическая активность антител также обусловлена не всей молекулой антитела, но лишь относительно небольшой ее активной группой, размеры которой не превышают размеров пептида из 3—5 аминокислотных остатков [2, 3, 4, 9].

Строение детерминирующей группы антигена несомненно как-то соответствует строению активной группы антитела. Некоторые исследователи считают, что эти группы имеют одинаковое строение [10, 11, 12]. Однако, по мнению большинства ученых, активная группа антител обладает конфигурацией, дополнительной к конфигурации детерминирующей группы антигена. Предполагают, что эти группы относятся друг к другу как предмет к своему зеркальному отображению или ключ к замку [13, 14].

Проблема образования антител сводится к вопросу о том, каким образом в ответ на введение в организм антигена с данной детерминирующей группой в его крови появляется белок, имеющий участок с подобным строением или дополняющий строение введенной детерминирующей группы. Выражаясь языком кибернетики, необходимо выяснить вопрос, каким образом происходит передача информации от детерминирующей группы антигена

ТЕОРИИ ОБРАЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ

Ответ различных исследователей на поставленный ниже вопрос можно найти в табл. 2, основанной на соответствующей таблице из обзора А. Бюссарда [14].

Наиболее простое объяснение соответствия строения детерминирующей группы антигена и активной группы антитела состоит в предположении, что детерминирующая группа антигена входит в состав активной группы антитела. Именно это предположение и лежит в основе ряда гипотез образования антител, начиная с высказанных в конце прошлого века гипотез Г. Бухнера [15] и Г. А. Смирнова [16], считавших, что антитело образуется из молекулы антигена. После того как стала ясна полная несостоятельность подобного взгляда, были сделаны попытки объяснить сходство между антигеном и антителом, предположив, что в состав антитела попадает обломок молекулы антигена, содержащий детерминирующую группу [10, 11].

Таблица 2

Способ передачи информации	Теория	Автор
I. Трансформация	1. Антиген превращается в антитело 2. Детерминирующая группа антигена превращается в активную группу антитела 3. Детерминирующая группа антигена, соединяясь с белками организма, образует аутокаталитически размножающиеся молекулы антитела	Бухнер, 1893 Смирнов, 1896 Менуоринг, 1930 Рамон, 1930 Иордан, 1940
II. Отбор предсуществующего	4. Отбор на молекулярном уровне: а) отбор боковых цепей б) отбор молекул глобулина 5. Отбор на клеточном уровне (теория селекции клонов)	Эрлих, 1906 Эрне, 1955 Телмедж, 1957 Барнет, 1957—1959
III. Изменение синтеза белка	6. Прямое влияние антигена: а) влияние на синтез пептидной цепи; б) влияние на скручивание пептидной цепи; в) закрепление третичной структуры 7. Косвенное влияние антигена: а) адаптация в дальнейшем частично самовоспроизводящихся энзиматических единиц; б) изменение ДНК, образование измененных РНК, матриц, синтез измененного белка	Брейнл и Гауровитц, 1930 Полинг и Гауровитц, 1940 Каруш, 1958 Барнет и Фенер, 1949 Швит и Оуен, 1957
IV. Смешанные теории		Монод, 1959 Бойден, 1960

Две группы фактов резко противоречат подобному объяснению. Прежде всего оказалось, что при иммунизации животных конъюгированными антигенами с известными детерминирующими группами (например, арсановой кислоты) эти группы в образовавшихся антителах обнаружить не удается [17].

Второе противоречие заключается в том, что число образовавшихся молекул антитела значительно превышает количество введенных молекул антигена. Так, например, Кон и Папенгеймер [18] показали, что после инъекции человеку 0,36 μ г дифтерийного анатоксина в его организме образуется по 1 000 000 молекул антитела на каждую введенную молекулу антигена. Совершенно очевидно, что молекула дифтерийного токсина, имеющего молекулярный вес 72 000, не может распасться на такое количество обладающих детерминирующими свойствами обломков.

Во избежание этого затруднения П. Иордан предположил, что введенный антиген подвергается частичному ферментативному распаду. Про-

дукты распада соединяются с различными молекулами белка иммунизируемого животного. В редких случаях в результате комплексования образуются молекулы белка, способные аутокаталитически саморазмножаться. Дочерние молекулы (антитела) могут несколько отличаться от материнских молекул антигена [12].

Слабым местом теории П. Йордана является то, что она постулирует наличие аутокаталитического размножения молекул белка. Возможность подобного процесса отвергается современной биохимией.

Подводя итоги теориям, согласно которым антитело целиком или частично образуется из введенного антигена, можно сказать, что эти теории не получили подтверждения. Антитело, по-видимому, целиком строится из материала иммунизируемого организма.

В основе второй группы теорий лежит предположение, что все образуемые данным организмом антитела (или способность их образовывать) в том или ином виде предсуществуют в организме. С этой точки зрения никакой передачи информации от антигена нет. Введение антигена способствует лишь отбору и увеличению числа молекул, реагирующих с ним, активации систем, синтезирующих эти молекулы.

Первой из подобных теорий является знаменитая теория боковых цепей П. Эрлиха, считавшего, что протоплазма состоит из гигантского центрального ядра и боковых рецепторов, имеющих различное строение и поэтому соединяющихся с различными веществами. Введенный антиген соединяется с рецепторами, случайно оказавшимися способными реагировать с ним, затем происходит отторжение соединившихся с антигеном рецепторов и их регенерация в избыточном количестве [19]. Сейчас нет необходимости обсуждать достоинства и недостатки этой теории, которая не соответствует реальной картине строения клетки. Однако идея, лежащая в ее основе, была в несколько измененном виде возрождена в последнее время вновь и приобрела многочисленных сторонников среди иммунологов.

В 1955 г. Г. Эрне высказал мысль, что в организме происходит непрерывное образование и выбрасывание в кровотоки молекул глобулинов, отличающихся от обычных глобулинов по своей конфигурации. Некоторые из этих конфигураций могут случайно оказаться дополнительными к конфигурации детерминантной группы того или иного антигена. При введении в организм антигена он соединяется с молекулами глобулина, случайно имеющими участок с дополнительной конфигурацией, и переносит их в клетки, образующие антитела. Затем антиген отщепляется, а попавшие в клетку молекулы глобулина стимулируют синтез или саморепродукцию молекул, идентичных им [20].

Теория Г. Эрне сразу же привлекла внимание Д. Телмэджа [21], который подчеркнул наличие в ней ряда положительных моментов. Однако, по мнению Д. Телмэджа, более вероятно не внеклеточная селекция молекул белка, а селекция клеток. Согласно взглядам Д. Телмэджа, в организме имеются многочисленные популяции клеток, каждая из которых обладает наследственно-детерминированной способностью синтезировать лишь один определенный белок. Введение антигена приводит к отбору для размножения таких клеток, которые синтезируют белки, обладающие сродством к этому антигену.

Эти взгляды были в 1957—1959 гг. подхвачены Ф. Барнетом, развившим теорию селекции клонов [22, 23], основанную на следующих постулатах:

1. Строение молекул белка, в том числе и молекул антител, полностью контролируется генетическими механизмами в соответствии с кодированной информацией.

2. На поверхности мезенхимальных клеток имеются такие же специфические конфигурации, которые характеризуют антитела. Контакт с антигеном стимулирует различные клеточные реакции.

Ф. Барнет предполагает, что в течение эмбрионального развития образуется большое количество клонов мезенхимальных клеток с различной конфигурацией поверхности, способных вследствие этого реагировать с антигенами, имеющими дополнительную конфигурацию.

Клоны клеток, имеющих конфигурации, дополнительные к постоянно присутствующим в кровотоке антигенам, разрушаются в течение эмбриональной жизни. Именно этим объясняется, по мнению Ф. Барнета, то, что взрослые организмы не образуют антитела к «своему» материалу. У взрослого животного контакт клеток с соответствующим антигеном приводит к их пролиферации и превращению в клетки, синтезирующие соответствующие антитела.

Сторонники третьей группы теорий считают, что введение антигена животным изменяет синтез белка и вызывает появление в крови белков, ранее отсутствовавших в организме.

Некоторые исследователи считают возможным прямое влияние антигена на образование антител. Согласно этой точке зрения, антиген действует подобно шаблону. Так, например, Н. Ф. Гамалея в отличие от П. Эрлиха считал, что рецепторы не предсуществуют в клетке, но образуются в ней под влиянием антигена. Антиген, прошедший через клетку, оставляет в ней след, подобный тому, который выбивает печать в сургуче [24].

О возможности прямого влияния антигена на синтез пептидной цепи антитела писали еще в 1930 г. Ф. Брейл и Ф. Гауровитц [25]. По их мнению, образование молекул глобулинов сыворотки протекает непрерывно в клетках ретикуло-эндотелиальной системы на имеющихся там видовоспецифических матрицах. В результате притягивания и отталкивания между отдельными группировками матрицы и аминокислот, используемых для построения молекулы глобулина, аминокислоты образуют дополнительную к матрице конфигурацию. Последующее соединение ориентированных на матрице аминокислот приводит к появлению новых видовоспецифических молекул глобулина. Введенный в организм антиген попадает на матрицы и оказывает влияние на процесс образования глобулина, направляя его таким образом, что вместо нормального глобулина образуется антитело. Присутствие антигена оказывает влияние на синтез пептидной цепи. Правда, оно не приводит к изменению аминокислотного состава образующихся молекул, но изменяет последовательность чередования аминокислот и их пространственное расположение. В результате в молекуле глобулина появляется участок с конфигурацией, дополнительной к конфигурации детерминантной группы антигена. Вместо неспецифического глобулина образуется антитело. Следовательно, детерминирующая группа антигена играет роль штампа при образовании активной группы антитела, что и обеспечивает возможность образования антител к самым разнообразным антигенам, в том числе и антигенам, никогда ранее не попадавшим в организм. Сходные взгляды высказали Д. Александер и С. Мадд [26].

В 1940 г. Л. Полинг [27] опубликовал теорию, очень близкую высказываниям Ф. Брейла и Ф. Гауровитца. Согласно теории Л. Полинга, введенный антиген проникает в места, где происходит образование γ -глобулинов, и изменяет процесс биосинтеза этого белка таким образом, что вместо молекул неспецифических γ -глобулинов образуются молекулы антител, имеющие участки с конфигурацией, дополнительной к конфигурации детерминирующей группы антигена. Образование дополнительной конфигурации вовсе не должно сопровождаться изменением аминокислотного состава или порядка чередования аминокислот в пептид-

ной цепи. Молекулы антигена содержат такую же полипептидную цепь, как и молекулы неспецифического γ -глобулина, а отличаются от них лишь в отношении способа, которым эта полипептидная цепь скручивается в трехмерную глобулу.

Ф. Гауровитц после опубликования теории Л. Полинга отказался от своего первоначального утверждения, что антиген влияет на строение полипептидной цепи. Он присоединился к мнению, что действие антигена сказывается лишь на характере свертывания полипептидных цепей [13, 28].

Согласно утверждениям Гауровитца—Полинга, немыслимо себе представить синтез молекулы антитела и молекулы белка вообще без участия матрицы, шаблона. Как же осуществляется влияние матрицы? Действие межмолекулярных электрических сил может играть существенную роль лишь на расстоянии до 6—8 Å. Поскольку молекулы глобулина имеют диаметр 20—100 Å, шаблон может определять их строение лишь в том случае, если процесс протекает в растянутой мономолекулярной пленке. Поэтому первая ступень синтеза белка состоит в образовании позитивного двумерного отпечатка с первичного шаблона. Антиген, по мнению исследователей, не оказывает никакого влияния на данный процесс. Следующая стадия биосинтеза белка заключается в свертывании белковой пленки и образовании трехмерной глобулярной молекулы. Вмешиваясь в процесс свертывания двухмерной пептидной пленки, антиген вызывает образование отпечатка, имеющего дополнительную конфигурацию к конфигурации его детерминирующей группы. Антиген играет роль вторичного шаблона.

Очень важный вывод из теории Гауровитца-Полинга заключается в том, что антитела не отличаются ни между собой, ни от неспецифических γ -глобулинов по химическому составу. С точки зрения ученых, придерживающихся этих взглядов, синтез антител не отличается чем-либо существенным от синтеза других белков организма. На свертывание двухмерной пептидной пленки при образовании «обычных» белков оказывают влияние различные соединения, входящие в состав клеточного содержимого и находящиеся в непосредственной близости от места, где происходит синтез. Косвенно в пользу изменчивости синтеза белка говорят данные об изменении антигенных свойств белков в онтогенезе [29, 30] и при различных заболеваниях [31]. Ф. Гауровитц согласен с Тейлором [32], считающим, что «обычные» белки являются ауто-антителами и что нет принципиального различия между «обычными» белками и антителами.

К рассматриваемой группе теорий относится и недавно появившаяся теория Ф. Каруша [33]. Автор утверждает, что образование полипептидной цепи и порядок чередования в ней аминокислот связаны с матрицей, в процессе отделения от которой полипептидная цепь приобретает вторичную и третичную конфигурацию. Антиген не влияет на этот процесс, в результате чего возникает молекула предшественника γ -глобулина, существующая в редуцированном состоянии. В молекуле предшественника имеется лабильный участок, который может принимать большое количество различных конфигураций. Когда конфигурация такого лабильного участка становится дополнительной к конфигурации детерминирующей группы антигена, происходит соединение этих веществ. Вслед за этим в молекуле предшественника γ -глобулина замыкаются дисульфидные связи, конфигурация лабильного участка γ -глобулина закрепляется и предшественник γ -глобулина превращается в антитело. Антиген, согласно этой точке зрения, служит болванкой, на которой происходит стабилизация лабильного участка.

Наряду с изложенными взглядами, предполагающими наличие прямого вмешательства детерминирующей группы антигена в синтез молекулы антитела, существуют и другие точки зрения, основанные на признании

возможности непрямого действия антигена. Согласно этим теориям, антиген влияет не непосредственно на синтез молекул антитела, но на механизмы, обеспечивающие синтез.

В первую очередь необходимо остановиться на теории Ф. Барнета и Ф. Фенера, опубликованной в 1949 г. [34]. Указанные авторы подчеркивают сходство между образованием антител и индуцируемых ферментов. Отсутствует образование антител на циркулирующие в кровотоке вещества, говорит, по мнению этих авторов, в пользу того, что клетки ретикуло-эндотелиальной системы обладают способностью отличать «собственный», «свой», материал (материал «своей метки») от «чужеродного, не своего». При попадании в организм чужеродных медленно разрушающихся веществ происходит адаптация к ним внутриклеточных «ферментных единиц», реагировавших раньше со «своим материалом». Адаптированные «ферментные единицы» способны специфически реагировать с антигеном и способны к самовоспроизведению. Особенно ускоряется самовоспроизведение под влиянием контакта с антигеном. При «частичном воспроизведении» этих «ферментных единиц» образуются попадающие в кровоток антитела. Антитела являются «ферментными единицами», сохранившими свойственную им специфическую конфигурацию, но лишенными их ферментной активности. Образование антител может происходить и после удаления антигена. Однако интенсивность этих процессов после удаления антигена непрерывно снижается. Повторное введение антигена резко их стимулирует.

В 1957 г. появилась теория Р. Швита и Р. Оуэна [35], согласно которой чередование аминокислот и конфигурация белков зависят от матриц, а начальная информация, необходимая для образования матриц, — от ДНК. Логическим следствием теории является признание, что первичное действие антигена состоит в изменении ДНК, которое может быть результатом соединения антигена с ДНК или какого-либо другого процесса.

При размножении клеток с измененной ДНК возникают популяции клеток, не содержащие антигена, но способные образовывать новые матрицы, на которых синтезируются белки (антитела), специфически реагирующие с антигеном. Помимо такого первичного действия антигена, он обладает и вторичным действием, которое заключается в стимуляции увеличения количества матриц, синтезирующих антитела, и активации уже имеющихся матриц.

Опубликован и ряд других теорий [36, 37], которые можно назвать смешанными. Однако на их обзоре здесь нет возможности останавливаться.

В течение последних 10—15 лет накопился большой фактический материал, позволяющий подойти к оценке изложенных взглядов.

Предположение Ф. Гауровитца и Л. Полинга о наличии дополнительной конфигурации в активной группе антитела и детерминирующей группе антигена получило всеобщее признание. Это предположение подтверждено при изучении реакции между антителом против различных азосоединений с производными этих соединений. Согласно опытам, различия между конфигурацией активной группы антитела и детерминирующей группы антигена в некоторых случаях не превышают 0,3 Å, что составляет лишь небольшую долю диаметра атома [38].

Эти представления соответствуют современным взглядам на причину специфичности взаимодействия фермента с субстратом и значения пространственных отношений для биологических систем [5].

В настоящий момент вопрос о наличии в молекуле антитела — участка, обладающего конфигурацией, дополнительной к конфигурации детерминирующей группы антигена, не вызывает сомнения. Значительно менее ясна причина возникновения такой конфигурации.

СВЯЗЬ ОБРАЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ С СИНТЕЗОМ НОВЫХ МОЛЕКУЛ БЕЛКА

Еще 5—6 лет назад не был решен даже такой важный вопрос, как вопрос о том, связано ли образование антител с синтезом новых молекул белка или с каким-либо другим процессом, например с превращением в антитела неспецифических γ -глобулинов. Возможность второго процесса была вполне мыслима с точки зрения теории Л. Полинга, поскольку образование антител не связывалось с биосинтезом молекул белка, имеющих пептидную цепь, отличающуюся от пептидной цепи неспецифических γ -глобулинов. Исходя из этого, Л. Полинг предположил, что при «расщатывании» молекулы глобулина различными денатурирующими агентами в присутствии антигена может произойти перестройка молекулы глобулина, образование в ней участка с конфигурацией, дополнительной к конфигурации детерминирующей группы антигена, и, следовательно, превращение неспецифических γ -глобулинов в антитела.

Соответствующие опыты были проведены Л. Полингом совместно с Д. Кемпбелом [39], причем в качестве антигенов использовалась метиленовая синька, 1,3-дигидрокси-2,3,6-три(п-азсфениларсиновокислый) бензол и полисахарид пневмококков типа III. Смесь одного из этих веществ с неспецифическим γ -глобулином быка подвергалась действию щелочи или нагреванию до 57° в течение 14 дней. В результате такой обработки неспецифические γ -глобулины, по данным Л. Полинга и Д. Кемпбела, приобретали способность избирательно реагировать с соответствующими антигенами.

Антитела или подобные им вещества были получены *in vitro* также в результате дегидрирования смеси антигена с плазмой при помощи различных отнимающих воду соединений. Появились также указания на возможность получения *in vitro* антител или подобных им веществ в результате дегидрирования смеси плазмы быка или глобулинов сыворотки со стафилококковым или дифтерийным токсинами [40, 41].

Однако эти работы не получили дальнейшего развития. Проверка данных Л. Полинга и Д. Кемпбела, проведенная А. М. Кузиным и И. А. Невраевой [42], дала противоречивые результаты: к 6 взятым в опыт антигенам антитела не образовались, но в отношении одного антигена (метиленовая синь) отмечено образование преципитинов. Более определенно о невозможности воспроизвести данные Л. Полинга и Д. Кемпбела говорится в сообщениях других ученых [43, 44, 45].

Недавно появилась работа Д. Луазелера о том, что, инкубируя *in vitro* при pH 10 яичный белок с сульфатом стрихнина, он получил вещества, защищающие крыс от стрихнинного отравления [46]. Однако, несмотря на это, большинство исследователей считает вопрос о возможности превращения *in vitro* неспецифических белков в антитела окончательно решенным в отрицательном смысле [2].

Значительно менее ясным был вопрос о возможности превращения в антитела неспецифических белков (в первую очередь неспецифических γ -глобулинов сыворотки) *in vivo* при иммунизации животного.

Использование аминокислот, меченных радиоактивными изотопами, позволило однозначно решить этот вопрос. Опыты, проведенные П. Гросом с сотрудниками [47], Г. Гринном и Г. Анкером [48] и нами [49], показали, что антитела образуются после иммунизации заново, а не путем превращения в них уже сформировавшихся молекул белка. В частности, они не образуются из неспецифических γ -глобулинов, находившихся в кровотоке. Об этом, например, свидетельствуют наши данные о том, что при введении меченой аминокислоты за 3 дня до инъекции антигена C^{14} -активность ан-

тител, появляющихся в крови через несколько дней после введения меченого глицина, была заметно меньше C^{14} -активности неспецифических γ -глобулинов. Между тем если бы наблюдаемое при иммунизации животного увеличение содержания антител происходило за счет превращения в антитела неспецифических γ -глобулинов, то содержание C^{14} в обеих фракциях должно было бы быть одинаковым или в случае увеличения общего содержания γ -глобулинов — меньшим в фракции неспецифических γ -глобулинов в связи с разбавлением ее вновь образовавшимися молекулами этого белка.

О том, что антитела образуются не из неспецифических γ -глобулинов, а синтезируются вновь из аминокислот, говорит более энергичное внедрение C^{14} -глицина в антитела в период нарастания их содержания, чем в неспецифические γ -глобулины [49, 50].

Ряд исследователей подтвердил этот вывод [51] и в настоящий момент он не вызывает сомнения.

СУДЬБА АНТИГЕНА В ОРГАНИЗМЕ

Теория Гауровитца — Полинга и Каруша требует непосредственного участия антигена в синтезе каждой молекулы антитела, Барнет, а также Швит и Оуен признают возможность образования антител без непосредственного участия антигена.

В связи с этим в последнее десятилетие проведено большое количество исследований, ставящих целью выяснить вопрос о возможности проникновения белкового антигена в клетки и длительности его пребывания в них. Подобные исследования проводились при помощи изотопного или иммунологического метода. Несмотря на то что при использовании изотопного метода всегда остается открытым вопрос, сохраняет ли метка связь с изучаемым белком, данный метод позволил получить ряд важных данных. Еще более определенные данные были получены при помощи иммуногистохимического метода, разработанного в 1951 г. А. Кунсом, Е. Ледюком и М. Капланом [52], а также других иммунологических методов.

В результате указанных исследований было установлено, что молекулы чужеродного белка без разрушения могут попадать внутрь клеток организма [52, 53, 54]. По-видимому, это происходит путем образования на поверхности клетки углубления, которое заполняется раствором чужеродного белка, а затем отграничивается подвигающейся с боков пленкой. В результате этого процесса («пиноцитоз») капля белкового раствора оказывается внутри клетки [55].

Уже через несколько минут после инъекции чужеродного белка он обнаруживается во фракции микросом, а позднее — митохондрий [56, 57, 58, 59]. Меньшее, однако вполне ощутимое количество чужеродного белка обнаруживается и в ядрах [56, 57, 58]. Быстро попадают в ткани и полисахаридные антигены.

Относительно давно имелись указания на возможность длительного сохранения введенных в организм полисахаридов [60]. В последние годы появились новые данные, подтверждающие это. Так, например, оказалось, что некоторые полисахариды, введенные мышам, обнаруживались в их тканях более года [61].

Раньше считалось, что белковые антигены, попав в ткани, очень быстро разрушаются там и теряют свои антигенные свойства. Появившиеся в последние десятилетия исследования (если даже учитывать только те из них, которые были получены иммунологическим методом) заставляют пересмотреть эту точку зрения [55, 62]. Так, Гарвей и Кемпбел обнаружили в печени кролика материал, обладающий иммунологическими свойствами

сывороточного альбумина быка спустя 21 день после инъекции антигена животному [63]. Мак Мастер и Крюзе при помощи реакции на сосудах уха мыши обнаруживали в печени мыши чужеродный белок даже через 40—101 день после его инъекции животному [64]. Эти данные частично устраняют одно из главных затруднений теории Гауровитца и Полинга. Однако нельзя считать, что затруднение устранено полностью: во многих случаях образование антител продолжается значительно дольше периода времени, в течение которого удается обнаружить антиген в тканях. Так, например, антитела к вирусу желтой лихорадки у вакцинированных лиц продолжают образовываться в течение 9 лет [65], а противостолбнячные антитоксины — 9—11 лет после окончания иммунизации [66].

До настоящего времени никем не доказана возможность столь длительного пребывания белковых антигенов в организме человека или животных. Вопрос осложняется тем, что продолжительность жизни многих клеток ретикуло-эндотелиальной системы, в которых происходит образование антител, по-видимому, не превышает нескольких дней [34]. Следовательно, молекулы антигена или их фрагменты должны не просто сохраняться в клетках организма, но передаваться от клетки клетке в течение многих поколений. Впрочем, даже установление факта, что антиген длительно сохраняется в тканях иммунизированных животных, не доказывает того, что образование антител происходит под непосредственным воздействием антигена. Антиген может сохраняться в клетках, не принимая участия в синтезе антител. Так, например, показано, что значительная часть клеток ретикуло-эндотелиальной системы, в которые попадает антиген при первичном его введении, впоследствии антител не образует [67].

ЛАТЕНТНЫЙ ПЕРИОД

Антитела появляются в крови иммунизированного животного не сразу после введения антигена, а через так называемый латентный период, который в зависимости от вида животного и используемого антигена длится от 3 дней до 4—6 недель. В последние годы изучению процессов, определяющих этот период, было посвящено много работ. Ряд исследователей считает, что антитела начинают образовываться сразу же после введения антигена, но в течение некоторого времени откладываются в тканях и лишь затем поступают в кровь [28]. Действительно, в ряде случаев показано, что в тканях, образующих антитела, они появляются раньше, чем в крови. Однако и в этих тканях они появляются не сразу после инъекции антигена, а спустя некоторое время [68, 69].

По мнению других ученых, латентный период может быть обусловлен тем, что образование антител протекает в несколько этапов. Первый этап состоит в накоплении какого-либо белкового или полипептидного предшественника, из которого уже затем образуется антитело.

Наконец, существование латентного периода может быть связано с тем, что биосинтез антител начинается не сразу. Сначала в ответ на введение антигена происходит образование и увеличение числа биологических структур, обеспечивающих синтез антител в дальнейшем или какие-либо другие процессы.

Грин и Анкер [48] на основании опытов по изучению включения меченых аминокислот в антитела в 1954 г. пришли к выводу, что образование антител начинается вскоре после инъекции антигена и что 30% антител образуется во время латентного периода до их появления в крови. Еще более решительный вывод сделали И. Я. Учитель и А. С. Конилова, считающие, что антитела образуются за несколько дней до их появления в крови [70, 71].

Однако в 1955—1957 гг. появились работы, показавшие, что это не так. Например, в латентный период мы вводили животному C^{14} -глицин, а затем измеряли C^{14} -активность антител, появляющихся в крови через несколько дней после этого. Совершенно очевидно, что если бы антитела или их предшественник образовывались в латентный период, то радиоактивная аминокислота включалась бы в них и выбрасываемые затем в кровоток антитела должны были бы содержать большое количество C^{14} . Между тем оказалось, что содержание C^{14} в появляющихся в крови антителах было незначительным [49, 50].

В полном соответствии со сделанным нами выводом о том, что в латентный период не происходит образования ни заметного количества антител, ни какого-либо их белкового или полипептидного предшественника, находятся и результаты появившейся в это же время работы Таллиаферро и Талмэджа [72]. Указанные исследователи изучали образование антител в организме неиммунизированного кролика после введения ему суспензии клеток селезенки, извлеченной в конце латентного периода из иммунизированного кролика. Вводя S^{35} аминокислоты кролику-донору или кролику-реципиенту и определяя содержание метки в антителах, авторы пришли к выводу, что антитела образуются целиком из материала реципиента после окончания латентного периода.

В последующие годы эти данные были подтверждены другими исследователями [73, 74].

Утверждение Грина и Анкера о возможности образования заметных количеств антител в латентный период было отвергнуто Диксоном и сотрудниками, изучавшими интенсивность включения S^{35} в антитела на разных стадиях иммунизации. Эти исследователи пришли к выводу, что антитела образуются незадолго до их появления в крови [75].

Большая работа по изучению природы латентного периода была проведена Штерцлем и другими исследователями, использовавшими для этой цели введение неиммунизированным животным суспензий клеток, взятых от иммунизированных животных [76].

В результате исследований стало очевидно, что в латентный период не образуется заметных количеств антител или их предшественника. В течение латентного периода, по-видимому, происходят биохимические изменения и морфологическая дифференциация клеток.

Наличие подобного процесса не предусматривается теориями Гау-ровитца — Полинга и Каруша. Исходя из этих теорий, можно было ожидать, что именно в первые дни после введения антигена, когда его в организме очень много, он должен в наибольшей степени вмешиваться в синтез γ -глобулинов и вызывать образование наибольшего количества антител. Значительно легче его согласовать с теориями непрямого действия антигена (Барнет и Фенер, Швит и Оуэн) и теорией селекции клонов (Барнет), т. е. с представлениями о том, что под влиянием антигена происходит образование или увеличение числа каких-то биологических структур, обеспечивающих биосинтез антител.

ПРИЧИНА РАЗЛИЧИЯ РЕАКЦИИ НА ПЕРВИЧНОЕ И ПОВТОРНОЕ ВВЕДЕНИЕ АНТИГЕНА

Большое значение для общей теории биосинтеза антител имеет изучение причины различной реакции организма на первичное и повторное введение ряда антигенов. После повторного введения многих антигенов (белки, сыворотки, анатоксины, эритроциты и т. д.) латентный период образования антител оказывается значительно меньшим, а количество образующихся

антител и продолжительность их образования — большими, чем после первичного введения этих же антигенов.

Впервые это явление систематически было изучено в 1910—1915 гг. М. Райским, который на основании опытов пришел к выводу, что при иммунизации развивается циклический процесс. Во время первого периода этого процесса происходит образование антител в ответ на введение антигена. Второй период начинается по прекращении введения антигена. В течение этого периода завершается усовершенствование механизма реакции организма на введение антигена [77, 78].

В последующие годы условия и законы повышения иммунологической активности после первичного введения антигена были подвергнуты глубокому физиологическому анализу в лаборатории П. Ф. Здродовского [79] и других лабораториях [80, 81, 34, 67]. Более энергичную реакцию в ответ на повторное введение антигена нельзя объяснить суммацией введенных порций антигена: двукратная иммунизация небольшими количествами антигена может вызвать несравненно более энергичное образование антител, чем однократное введение даже значительно большей дозы антигена. Разбираемое явление трудно согласуется с теорией Гауровитца — Полинга, не предусматривающей никакой перестройки организма под влиянием первичного введения антигена. В связи с этим Гауровитц отрицал сам факт более энергичного биосинтеза антител при повторной иммунизации и объяснял наблюдаемое в этих условиях быстрое нарастание содержания антител выбрасыванием в кровь из тканей резервных антител, образовавшихся еще при первичной иммунизации [28]. Если бы это было так, то на 4—6-й день после повторного введения такого антигена, как сывороточный альбумин лошади, в кровоток должны были бы поступать почти исключительно «резервные» антитела, так как при первичной иммунизации кролика этим антигеном антитела начинают образовываться лишь на 10—14-й день. Очевидно, что включение метки в резервные, давно образовавшиеся и теперь лишь выбрасываемые в кровь антитела должно было бы отсутствовать или быть незначительным. Между тем, как показали проведенные нами опыты, включение метки в антитела на 4—6-й день после повторной иммунизации протекало весьма энергично и могло в 5 раз превосходить включение метки в неспецифические γ -глобулины [49, 60].

На основании описанных опытов нами в 1955 г. был сделан вывод, что энергичное нарастание содержания антител при повторной иммунизации связано с их более энергичным биосинтезом, а не с выбрасыванием в кровоток резервных антител. Этот вывод был подкреплён рядом опытов, проведенных на кроликах, которые иммунизировались двумя антигенами и которым вскоре после этого вводили C^{14} -глицин. Через 14—17 дней повторяли инъекцию одного из антигенов и прослеживали изменение содержания метки в каждом из двух изучаемых антител. Очевидно, что если бы антитела поступали из резервов, то содержание метки в поступающих в кровь антителах при подобной постановке опытов должно было бы быть выше, чем в циркулирующих в кровотоке антителах. Однако в наших опытах наблюдалась обратная картина: поступающие в кровоток антитела содержали значительно меньшее количество метки, чем антитела, уже циркулировавшие в кровотоке [49, 50]. Правда, в недавно появившейся работе Гарвея и Кемпбела, производивших сходные опыты, говорится о поступлении в кровоток после повторного введения антигена антител с большим содержанием метки, чем в антителах, находящихся в кровотоке [82]. Трудно сказать, чем объясняется такое противоречие между нашими опытами и опытами указанных исследователей. Во всяком случае, как видно из данных, приводимых Гарвеем и Кемпбелом, количество поступающих в кровоток резервных антител весьма невелико.

Вывод о том, что при повторной иммунизации происходит более интенсивный биосинтез антител, сделали также Диксон с сотрудниками, изучавшие интенсивность внедрения в антитела меченых аминокислот на разных стадиях иммунизации [75]. К подобному же выводу в последние годы пришли и другие исследователи, изучавшие этот процесс в опытах, проводившихся на срезах тканей *in vitro* и в опытах с введением неиммунизированному животному суспензии клеток, взятых после повторной иммунизации животного-донора [72, 73, 74, 83].

В лаборатории Гауровитца была сделана попытка опровергнуть этот вывод и доказать, что при повторной иммунизации в крови выбрасывается большое количество «резервных» антител. В 1957 г. Ченг и Гауровитц опубликовали предварительное сообщение о работе, в которой S^{35} -аминокислоты вводились в период первичной иммунизации и в антителах, появившихся после повторной иммунизации, определялось содержание S^{35} . Полученные данные, по мнению Гауровитца, подтверждают предположение, что значительная часть антител, выявляемых после повторного введения антигена, образуется еще в период первичной иммунизации [84]. Однако в 1960 г. появилась подробная работа Рихтера и Гауровитца, в которой сообщается об изучении включения метки в два одновременно образующихся антитела, синтез одного из которых был вызван первичной, а второго — повторной иммунизацией. Подводя итоги этой работы, авторы вынуждены признать, что лишь небольшое количество антител, образовавшихся в интервале между первичным и вторичным введением антигена, поступает в кровь при повторной иммунизации [85]. В обзоре 1960 г. Гауровитц также пишет, что количество резервных антител не может быть очень большим [62].

Таким образом, в настоящий момент можно считать окончательно установленным, что повторное введение многих антигенов вызывает значительно более интенсивный биосинтез антител, чем первичное. Подобный эффект трудно объяснить с точки зрения теории Гауровитца — Полинга. Значительно понятнее он с позиции исследователей, признающих, что введение антигена вызывает перестройку организма, появление или увеличение количества биологических структур, синтезирующих антитела.

Несмотря на последующее снижение скорости биосинтеза антител, эти структуры частично сохраняются, на что указывает наличие неспецифической анамнестической реакции, обнаруженное, в частности, в опытах Уейгла [67]. Он первоначально иммунизировал кроликов сывороточным альбумином быка (САБ). При этом образовались антитела двух типов: анти-САБ и антитела, обладающие двойной специфичностью, которые реагировали не только с САБ, но и с сывороточным альбумином человека (САЧ). В тех случаях, когда через некоторое время кроликам вводился САЧ, то в их крови появлялись антитела с двойной специфичностью, реагировавшие с обоими изучаемыми белками. Наряду с этими антителами в крови подопытных животных появлялись антитела против САБ, не реагировавшие с САЧ. Появление при повторной иммунизации в крови животного антитела, которое не реагирует с антигеном, введенным для повторной иммунизации, но взаимодействует с антигеном, применявшимся для первичной иммунизации, ясно указывает на наличие и активацию каких-то биологических структур, сохраняющих информацию от первичной иммунизации.

ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНАЯ ФАЗА НАРАСТАНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АНТИТЕЛ

Изучение включения меченых аминокислот в антитела убедительно показывает, что между синтезом молекул антитела и появлением их в кровотоке проходит немного времени. Поэтому анализ кривой изменения

содержания антител позволяет делать некоторые выводы об изменении динамики биосинтеза антител.

Обычно сразу после окончания латентного периода наблюдается относительно медленное нарастание содержания антител, а затем этот процесс начинает ускоряться. Барнет показал, что после повторной иммунизации наступает период, в течение которого титры антитоксинов нарастают по экспоненциальной кривой [34]. На наличие подобной фазы нарастания содержания антител указывали и некоторые другие иммунологи [86, 87].

Мы проанализировали эту фазу при помощи количественного иммунохимического метода.

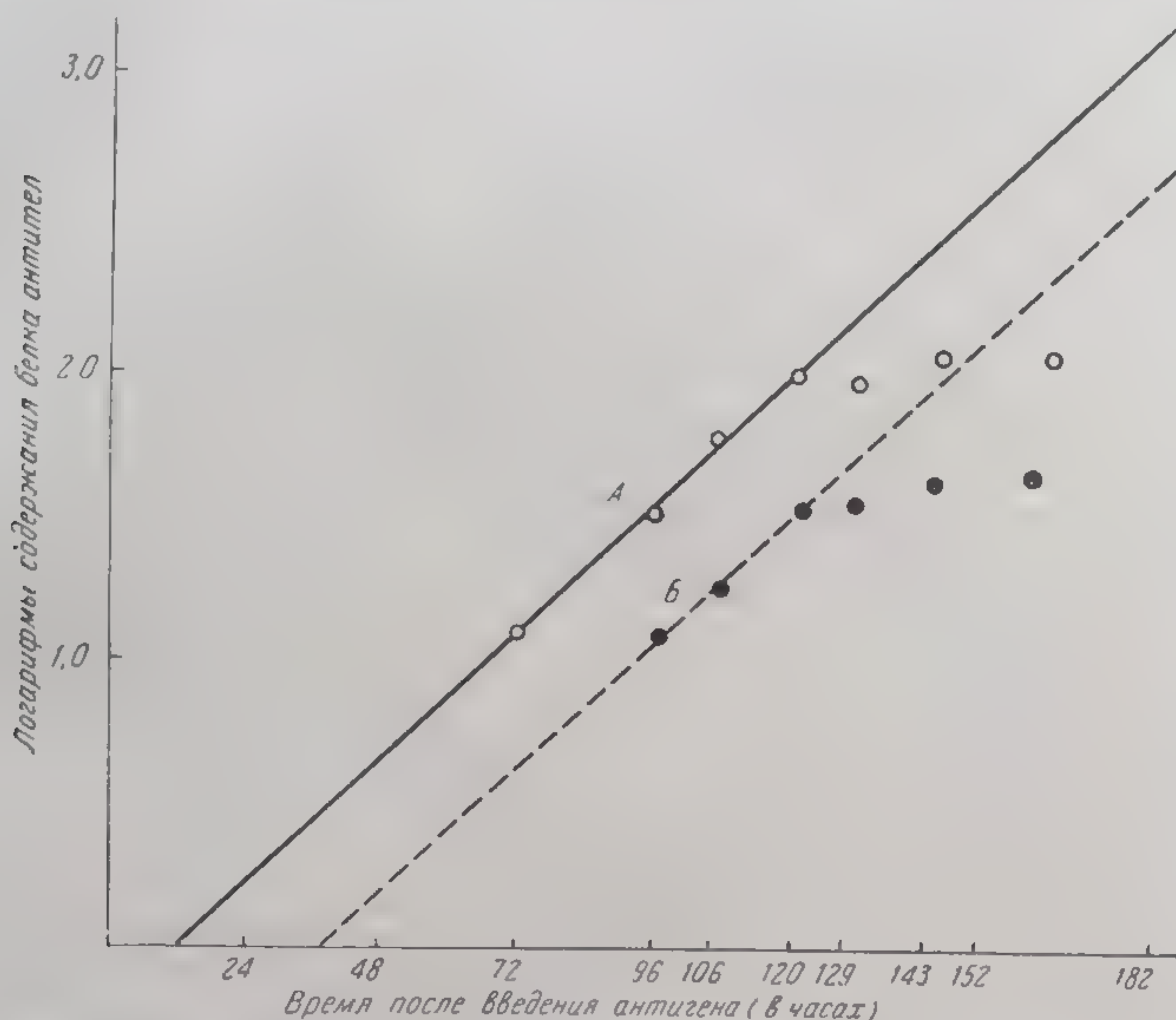


Рис. 2. Нарастание содержания антител после повторной иммунизации кролика сывороточными альбуминами человека (А) и лошади (Б).

На рис. 2 представлены кривые изменения содержания двух антител в крови кролика после повторной его иммунизации сразу двумя антигенами: сывороточным альбумином человека (А) и сывороточным альбумином лошади (Б).

Как видно из представленного рисунка, в течение определенного периода времени увеличение содержания антител в крови протекало строго логарифмически, но затем резко замедлялось. Обращает на себя внимание также полный параллелизм обеих кривых.

Экспоненциальный характер нарастания содержания антител, по мнению Барнета [34], связан с пролиферацией биологических структур, отвечающих за синтез антител. Трудно не согласиться с этим взглядом.

Интересные вопросы возникают при попытке представить себе, что было бы, если бы экспоненциальная фаза нарастания содержания антител продлилась еще некоторое время. Экстраполяция приведенных кривых показывает, что в этом случае содержание антител против альбумина че-

ловека через 2 суток стало бы равным количеству всех белков сыворотки, а еще спустя 4 суток превысило бы общее содержание белков в организме кроликов. Однако в действительности интенсивность нарастания содержания антител быстро снижается, и вскоре образование антител прекращается почти полностью.

В некоторых наших опытах интенсивность биосинтеза антител на 11-й день после введения антигена составляла лишь 3% ее максимальной величины, наблюдавшейся через 5 дней после введения антигена [49, 50]. Близкие величины были получены несколько другим способом Диксоном с сотрудниками [75]. Торможение образования антител выявлялось и иммунологическими методами [79].

Быстрое уменьшение скорости биосинтеза антител объяснить трудно. Как показали наши опыты с иммунизацией кроликов двумя белками, в период торможения образования одного антитела может происходить весьма интенсивный биосинтез другого [50, 88]. Следовательно, быстрое снижение скорости образования антител не связано с простым исчерпанием материалов, необходимых для построения их молекул.

Нами было высказано предположение, что рассматриваемое явление обусловлено возникновением в организме специфических ингибиторов, которые тормозят биосинтез данного антитела, не влияя на синтез всех остальных антител [88]. Для выяснения справедливости этого предположения в настоящий период проводятся специальные опыты.

СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ БИОСИНТЕЗОМ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ γ -ГЛОБУЛИНОВ И АНТИТЕЛ

Большое принципиальное значение имеет изучение соотношения между биосинтезом неспецифических γ -глобулинов и антител. Если, как предполагали Гауровитц, Полинг и Каруш, антитела и γ -глобулины образуются из одних и тех же полипептидных цепочек, одних и тех же «заготовок», то должна иметь место взаимная конкуренция между процессами образования неспецифических γ -глобулинов и антител в отношении «полипептидных заготовок». Точно такая же конкуренция должна была бы существовать и между двумя процессами образования каждого из антител.

В литературе имеются многочисленные указания на то, что при различных способах иммунизации происходит увеличение общего содержания γ -глобулинов [89, 90, 91, 92, 93]. Это увеличение наблюдалось в подавляющем большинстве случаев, однако не всегда [94, 95].

Значительно сложнее вопрос о соотношении между изменением содержания неспецифических γ -глобулинов и антител.

Сочетая электрофоретическое определение количества γ -глобулинов с иммунохимическим определением количества антител при различных способах иммунизации, мы выявили сложность взаимоотношения между изменением содержания этих белков и наличие известной независимости между ходом кривых изменения содержания антител и неспецифических γ -глобулинов [49]. В известной мере независимо друг от друга протекают и процессы биосинтеза двух антител [50].

Биосинтез неспецифических γ -глобулинов не тормозился даже в период чрезвычайно интенсивного образования антител, о чем говорит сохранение нормальной скорости разведения метки неспецифических γ -глобулинов, если они были заранее помечены введением C^{14} -глицина. Будучи введенным в период чрезвычайно интенсивного образования антител, C^{14} -глицин включался в неспецифические γ -глобулины примерно с такой же интенсивностью (52 000 имп/мин на 1 г белка), как и в норме (54 000 имп/мин на 1 г белка) [49, 50, 88].

В пользу развиваемого нами тезиса в известной независимости биосинтеза неспецифических γ -глобулинов и антител косвенно говорят опыты Рихтера. Он показал, что если при иммунизации кролика сывороткой лошади ввести иммунизируемому животному рибонуклеотид натрия, то происходит значительное увеличение содержания γ -глобулинов, хотя интенсивность образования преципитинов не изменяется или даже снижается [96]. Косвенно в пользу различия между процессами биосинтеза антител и неспецифических γ -глобулинов говорит также отсутствие корреляции между общим содержанием γ -глобулина и способностью образовывать антитела при иммунизации вакциной тифа у больных диабетом [97]. Нет соответствия между этими величинами и у больных некоторыми другими заболеваниями. Так, например, у одного больного с поражением печени содержание γ -глобулинов достигало 66% всех белков сыворотки. Образования же у него антител в ответ на введение полисахаридов обнаружить не удалось [98].

γ -ГЛОБУЛИНЫ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ПОДВИЖНОСТЬ АНТИТЕЛ

Для оценки правильности различных теорий биосинтеза антител большое значение имеет изучение физико-химических свойств антител и сравнение их с физико-химическими свойствами других белков сыворотки.

В 1937 г. уже во второй работе по электрофорезу, выполненной при помощи сконструированного им аппарата, Тизелиус сделал вывод, что «функция антител мигрирует лишь с γ -глобулиновой фракцией» [93].

В настоящий момент накопился огромный материал, указывающий на то, что антитела локализованы во фракции γ -глобулинов. В отношении большинства антител это сейчас не вызывает сомнения. Достаточно напомнить, что препараты γ -глобулинов, выделенные из сывороток людей и животных, получили широкое распространение в качестве источника антител для лечения и профилактики кори, краснухи, гепатита, полиомиелита, свинки, коклюша, дифтерии, столбняка, газовой гангрены и других заболеваний [99, 100, 101].

Однако ряд фактов противоречит представлению, что антитела представляют собой лишь γ -глобулины.

Прежде всего имеется довольно большое количество данных в пользу того, что некоторые виды антител при электрофорезе мигрируют не с γ -, но с β - или даже с α_2 -глобулинами.

В течение ряда лет изучалось распространение различных антител в фракциях сыворотки, выделенных при помощи электрофоретической конвекции. Во фракциях β - и даже α -глобулинов были обнаружены антитела, обуславливающие повышенную чувствительность к крестовнику или яичному альбумину. Во фракции α -глобулинов содержались в некоторых случаях и Rh антитела [102, 103].

Изучение отдельных фракций сыворотки, выделенных при помощи электрофореза в крахмальном блоке сыворотки кроликов, иммунизированных яичным альбумином, показало, что преципитирующие антитела всегда мигрируют с γ -глобулинами, а антитела, сенсibiliзирующие кожу, мигрируют в большей степени с β - и α -глобулинами [104].

Очень интересные данные по этому вопросу получены в лаборатории, руководимой В. И. Ойвиным. Было показано, что на 4—5-й день после заражения кролика дизентерией противодизентерийные антитела локализованы во фракции α_2 -глобулинов. В дальнейшем (на 10—12-й день) антитела появлялись также и во фракции β - и α -глобулинов [105]. Аналогичные отношения наблюдались и у заболевших дизентерией людей [106].

Электрофоретическая локализация антител, по-видимому, может меняться в зависимости от стадии иммунизации и других факторов [107, 108].

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕСА АНТИТЕЛ И γ -ГЛОБУЛИНОВ

При первых же опытах по изучению молекулярного веса антител было обнаружено, что противопневмококковые антитела сыворотки кролика имеют константу седиментации 7 S и молекулярный вес 150 000, т. е. были идентичны по этому показателю неспецифическим γ -глобулинам кролика. В отличие от этого противокорковые антитела из сыворотки лошади были значительно тяжелее γ -глобулинов этой сыворотки. Они обладают константой седиментации 18 S и молекулярным весом около 1 000 000 [109]. Оказалось, что «тяжелые» антитела с константами седиментации 18—19 S и молекулярным весом 910 000—930 000 образуются при иммунизации пневмококком не только у лошадей, но и у свиней и коров. Иммунизация тем же антигеном кроликов, обезьян и людей приводит к появлению антител с константой седиментации 7 S и молекулярными весами 156 000—195 000 [110].

Дальнейшие исследования показали, что животные, образующие «тяжелые» противопневмококковые антитела, могут синтезировать также и противопневмококковые антитела, близкие по молекулярному весу к γ -глобулинам. И, наоборот, животные, противопневмококковые антитела которых близки по молекулярному весу к γ -глобулинам, могут образовывать антитела со значительно большим молекулярным весом. Так, например, большинство антител, вырабатываемых кроликом, имеют константу седиментации 7 S. При иммунизации же кроликов эритроцитами барана в их крови появляются два «тяжелых» антитела [111]. Еще сложнее картина у человека. Ряд антител в его сыворотке ассоциирован с 7 S-глобулинами. Однако вассермановские антитела содержат два компонента: 6,5—7,0 S и 18,5—19,1 S [9]. Холодовые агглютинины осаждались со скоростью, соответствующей 17 S и имели молекулярный вес 330 000—350 000 [112]. Изоагглютинины β (A_1O) обладают константой седиментации 15,5 S и молекулярным весом 500 000, изоагглютинины β (A_1A_1) обладают константой седиментации 11 S и молекулярным весом 300 000. Наконец, изоагглютинины β (00) обладают константой седиментации 6,5 S и молекулярным весом 170 000 [113].

На основании приведенных фактов можно сделать вывод, что антитела с одной и той же специфичностью у различных животных могут обладать совершенно различными молекулярными весами [9].

Следующий важный вывод состоит в том, что по молекулярному весу антитела могут отличаться от γ -глобулинов. В ряде случаев совершенно непонятно, какому компоненту сыворотки неиммунизированного животного соответствуют по молекулярному весу отдельные антитела. Можно предположить, что образование «тяжелых антител» связано с ассоциацией нескольких молекул 7 S-антител. Однако до сих пор нет экспериментальных данных в пользу этого предположения. Против него говорит то, что молекулы «тяжелых антител» не содержат большего количества активных групп, чем молекулы обычных антител.

АНТИТЕЛА И γ -ГЛОБУЛИНЫ

Подводя итог сказанному, можно с полным основанием утверждать, что хотя значительная часть антител ассоциирована с γ -глобулинами, имеются антитела, которые значительно отличаются от γ -глобулинов как

по электрофоретической подвижности, так и по молекулярному весу. Следовательно, нет основания отождествлять понятие «антитела» с понятием « γ -глобулины»; антитела могут и не быть γ -глобулинами.

Впрочем, этот вопрос сильно осложнился в последнее время, так как было найдено, что с иммунной сывороткой, полученной при иммунизации животного γ -глобулинами, реагирует некоторое количество и более быстро мигрирующих белков. Благодаря этому иммуноэлектрофоретическое исследование, проведенное по методу Грабаря, выявляет в области γ -глобулинов своеобразную картину: линии осадков не имеют выраженной выпуклости, лежат почти горизонтально и простираются в длину от нулевой точки до зоны α_2 -глобулинов. Проанализировав это явление, П. Грабарь сделал вывод, что γ -глобулины представляют семейство белков с очень различной электрофоретической подвижностью (начиная с подвижности наиболее медленно мигрирующих компонентов α_2 -глобулинов и кончая подвижностью α_2 -глобулинов, однако обладающих общей антигенной специфичностью) [114].

Таким образом, в настоящий момент существует два несовпадающих определения γ -глобулинов: по их электрофоретической подвижности и по их антигенным свойствам.

Взгляды П. Грабаря были подтверждены обнаружением белков, осаждаемых иммунной сывороткой против γ -глобулина в растворах электрофоретически чистых α - и β -глобулинов, выделенных из сыворотки человека при помощи электрофореза в крахмальном блоке [115].

Какова же природа этих белков, мигрирующих при электрофорезе с α - и β -глобулинами, но имеющих такие же антигенные свойства, как и γ -глобулины? Идентичны ли эти белки тем антителам, которые обнаруживаются в α - и β -глобулинах? Пока еще нет никаких экспериментальных данных для ответа на эти вопросы.

Важное значение имеет вопрос о том, состоит ли фракция γ -глобулинов только из антител к различным антигенам, как это предполагал Бойд [2], или наряду с антителами в эту фракцию входят какие-то другие белки. Под неспецифическими γ -глобулинами обычно подразумевают все γ -глобулины, не реагирующие с изучаемым антигеном. Несомненно, значительная часть этой фракции представляет смесь антител ко многим антигенам. Однако не исключено, что в нее входят и белки, не связанные с иммунитетом, а несущие другие функции.

В последние годы для выяснения этого вопроса были сделаны попытки использовать животных, выращенных в стерильных условиях и не подвергавшихся действию микробов. Изучение животных (крысы, кролики, цыплята, морские свинки), находящихся в подобных условиях, показало, что содержание γ -глобулинов у них было значительно снижено [116, 117]. Однако лишь у отдельных животных оно достигало нуля; у подавляющего же большинства оно сохранялось на заметном уровне, который не снижался даже у пятой генерации крыс, находящихся в подобных условиях [118].

Эти данные, казалось бы, могли рассматриваться как доказательство того, что во фракции γ -глобулинов, помимо антител, присутствует некоторое количество белка, несущего другую функцию. Впрочем, нельзя исключить, что и у животных, находящихся в стерильных условиях, все же происходит образование антител. Поводом для их образования могла бы являться внутрикишечная иммунизация животных пищевыми веществами, аутоиммунизация их продуктами распада тканей и т. д.

Изучая соотношение между временем появления в крови новорожденных животных антител и γ -глобулинов, Штерцль [76] пришел к выводу, что все обнаружимые в сыворотке γ -глобулины являются антителами. Этот вывод весьма правдоподобен, хотя его нельзя считать окончательно дока-

занным. Более осторожно в настоящий момент обозначать «неспецифическими γ -глобулинами» все γ -глобулины, не реагирующие с изучаемым антигеном, не предпринимая вопроса о том, состоит ли эта фракция лишь из смеси антител или в ней присутствуют, кроме того, и белки, несущие иную функцию.

СРАВНЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ОТДЕЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ γ -ГЛОБУЛИНОВ

Работы, в которых проводилось сравнение состава антител и неспецифических γ -глобулинов, имеют особый интерес для оценки теории Гауровитца-Полинга, согласно которой антитела и неспецифические γ -глобулины не отличаются между собой по составу, но отличаются лишь формой скручивания полипептидных цепочек [27, 28, 62].

Данные, полученные по этому вопросу до 1950 г., подробно изложены в соответствующих обзорах [2, 119, 120].

Начиная с 1950 г., был предпринят ряд попыток выяснить строение N-концевого пептида антител и неспецифических γ -глобулинов. Впервые подобное исследование при помощи динитрофторбензола провел Портер [121], который для исследования брал γ -глобулин неиммунизированного кролика и кролика, иммунизированного яичным альбумином (до и после осаждения антител). Кроме того, действию динитрофторбензола подвергался недиссоциированный преципитат, полученный осаждением антител яичным альбумином. Поскольку яичный альбумин не реагирует с динитрофторбензолом в этих условиях, выявлялись лишь N-концевые аминокислоты антител. По данным Портера, во всех изученных фракциях единственной N-концевой аминокислотой является аланин (1,0—1,2 М на 1 М белка), а конечным пептидом — Ала.-Лей.-Вал.-Асп.-Глю.

Данные Портера подтвердили Орланс [122], Макфаден и Смит [123], изучавшие неспецифические γ -глобулины кролика и кроличьи антитела против альбумина быка к 9 различным пневмококкам. Правда, помимо N-концевого аланина, эти авторы обнаружили наличие и некоторого количества N-концевой аспарагиновой кислоты (0,2—0,4 М).

Недавно появилась работа, противоречащая указанным исследованиям. М. С. Резниченко, В. П. Моисеева, Л. И. Плотнова, С. Е. Тукачинский нашли, что в γ -глобулине кролика N-концевыми аминокислотами, помимо аланина, являются тирозин, лизин, серин, глютаминовая и аспарагиновая кислоты [124].

Впрочем, если даже признать правильность данных об однородности γ -глобулинов кролика в отношении N-концевой аминокислоты, то это является скорее исключением, чем правилом. В γ -глобулине быка при помощи динитрофторбензола выявляется по крайней мере 5 N-концевых аминокислот, содержащихся в следующих количествах (моли аминокислот на моль белка): аспарагин — 0,13, серин — 0,09, глютаминовая кислота — 0,15, аланин — 0,09 и валин — 0,11 М [125]. Семь различных N-концевых аминокислот выявлено и в γ -глобулине лошади [126]. Неоднородным в этом отношении оказался и γ -глобулин человека, в котором на 1 моль белка найдено примерно по 1 молю N-концевой аспарагиновой и глютаминовой кислот. Впрочем, возможно, что в этом случае наличие двух N-концевых аминокислот обусловлено не присутствием молекул различного строения, но разветвленностью конечной части цепи γ -глобулина, имеющего следующее строение [127].

Асп. } (Вал. Лей.) Сер.
Глю. } (Асп. Глю. Тре. Ала. Лиз.) Гли.

Помимо N-концевых аспарагиновой и глутаминовой кислот, в γ -глобулине человека выявляется также небольшое количество N-концевого серина [125]. Фракции II — 1,2 и II — 3 несколько отличаются друг от друга по соотношению этих групп [125]. Могут отличаться в этом отношении от γ -глобулинов и миеломные белки [128].

Не согласуются с выводом об идентичности γ -глобулинов и антител также и данные очень интересной работы Мак Фадден и Смита [126], в которой они сравнивали между собой N-концевые аминокислоты γ - и T-глобулинов лошади и лошадиных противопневмококковых антител, выделенных специфическим методом. Различия между γ - и T-глобулинами обнаружить не удалось, но противопневмококковые антитела содержали заметно большее количество N-концевого аланина (табл. 3).

Таблица 3

Содержание N-концевых аминокислот в γ -глобулине и антителах лошади
(аминокислотные остатки в молях на 160 000 г белка)

Наименование белка	Асп.	Глю.	Сер.	Тре.	Ала.	Вал.	Лей.	Общ.	Лиз.
γ -глобулин	0,15	0,09	0,09	0,03	0,06	0,015	0,17	0,74	76
T-глобулин	0,19	0,07	0,16	0,09	0,16	0,16	0,14	0,81	74
Антитело противопневмо- кокковое	0,23	0,10	0,07	—	0,44	0,18	0,09	1,11	73
То же	0,23	0,18	0,14	—	0,38	0,18	0,08	1,19	74

Сообщение о различии в составе N-концевых аминокислот γ -глобулина быка и бычьего антитела недавно опубликовали Пресс и Портер [129]. Таким образом, имеющиеся в литературе данные о характере N-концевых аминокислот антител и неспецифических γ -глобулинов довольно разноречивы. Кроме того, доказательство сходства антител и неспецифических γ -глобулинов в отношении N-концевых аминокислот или N-концевых пентапептидов, конечно, не доказывает сходства этих белков в отношении всей пептидной цепи.

Несколько большее значение, чем работы по сравнению N-концевых аминокислот, имеют исследования, в которых сравнивался общий аминокислотный состав отдельных антител и неспецифических γ -глобулинов. В первую очередь следует упомянуть о работе Смита с сотрудниками, выполненной в 1955 г. [130]. Эти авторы, используя метод Мура и Штейна, сравнили аминокислотный состав четырех антител кролика против пневмококков типа I, VII, VIII, XIV, выделенных осаждением соответствующим полисахаридом. Они не обнаружили различия в аминокислотном составе четырех изученных белков.

Эти данные были восприняты многими исследователями как экспериментальное доказательство положения о том, что антитела отличаются между собой и от неспецифических γ -глобулинов лишь свертыванием полипептидной цепи. Однако не следует переоценивать значения данных, получаемых при суммарном аминокислотном анализе белков, для решения вопроса об идентичности отдельных белков. Конечно, обнаружение значительного расхождения в аминокислотном составе сравниваемых белков говорило бы против такой идентичности. Противоположный вывод, сделанный на основании суммарного аминокислотного анализа, очень ненадежен, так как подобный анализ не может уловить небольших различий между сравниваемыми белками. Как известно, различие в содержании даже 1—2 аминокислотных остатков может обуславливать биологические различия между белковыми гормонами или гемоглобинами [131, 132, 133].

Для сравнения близких белков значительно перспективнее использование метода «отпечатков пальцев», основанного на сопоставлении картины, получаемой после электрофореза и хроматографии (проведенных во взаимоперпендикулярных направлениях) ферментативных гидролизатов белков [131, 134]. С помощью этого метода в некоторых случаях удается выявить различие между очень близкими белками, отличающимися всего лишь на 1—2 аминокислоты.

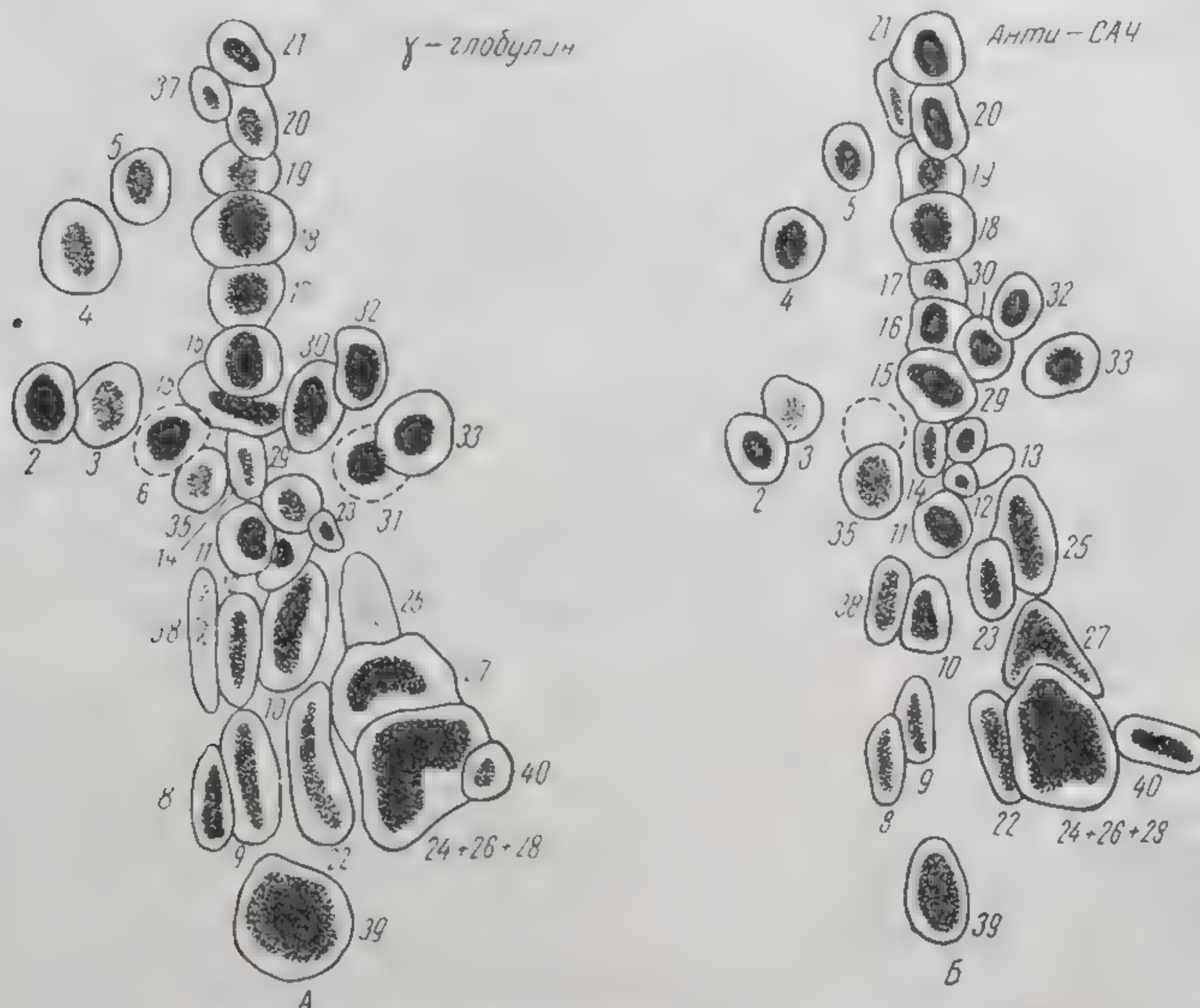


Рис. 3. Результаты электрофорез-хроматографического сравнения ферментативных гидролизатов неспецифического γ -глобулина кролика (А) и кроличьего антитела против сывороточного альбумина человека (Б).

Нами совместно с Л. М. Губерниевой и К. Н. Мясоедовой при помощи метода «отпечатков пальцев» были подвергнуты сравнению неспецифические γ -глобулины из сывороток неиммунизированных кроликов и два антитела [135]. Антитела против сывороточного альбумина человека и сывороточного альбумина лошади выделялись из сывороток кроликов, одновременно иммунизированных двумя соответствующими белками. Препараты антител были получены при помощи фиксированных на целлюлозе антигенов методом, разработанным нами ранее совместно с Р. Б. Капнер и Р. С. Незлиным [136, 137], и практически не содержали посторонних белковых примесей. Используемые для опытов препараты неспецифических γ -глобулинов также не содержали электрофоретически обнаруженных примесей. Сравнимые белки декатурировались ТХУ и переваривались трипсином и химотрипсином. Полученные гидролизаты подвергались электрофоретическому разделению в одном направлении и хроматографическому в другом, перпендикулярном первому.

На рис. 3 представлены результаты, полученные в одном из подобных опытов. На электрофорез-хроматограммах ферментативного гидролизата γ -глобулинов выявляется до 40 пятен (рис. 3, А). Описываемая картина отличается постоянством и хорошей воспроизводимостью даже в деталях.

Для сравнения близких белков значительно перспективнее использование метода «отпечатков пальцев», основанного на сопоставлении кинетических данных, получаемой после электрофореза и хроматографии (проведенных в перпендикулярных направлениях) ферментативных гидролизатов [131, 134]. С помощью этого метода в некоторых случаях удается выявить различие между очень близкими белками, отличающимися всего на 1—2 аминокислоты.

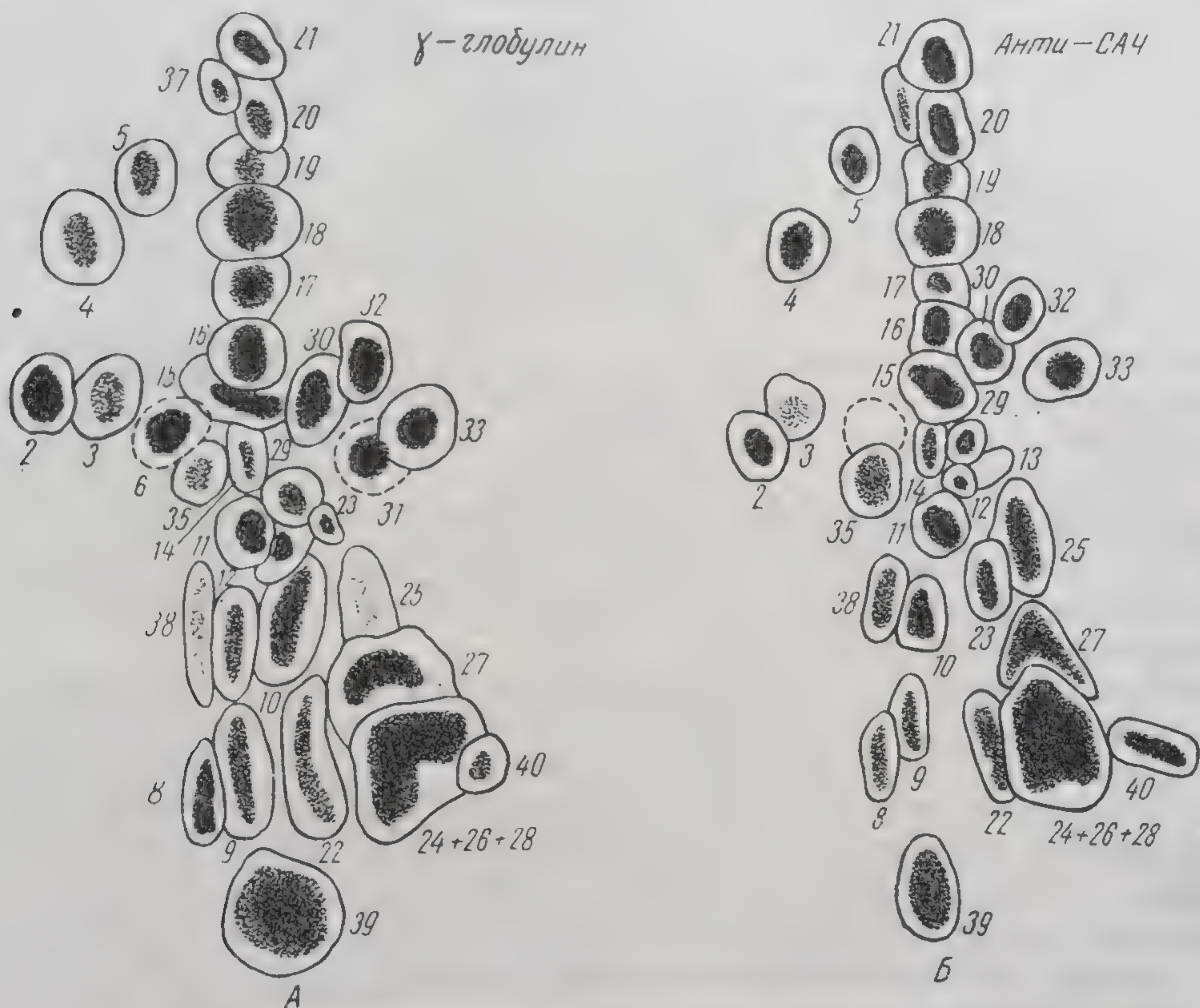


Рис. 3. Результаты электрофорез-хроматографического сравнения ферментативных гидролизатов неспецифического γ -глобулина кролика (А) и кроличьего антитела против сывороточного альбумина человека (Б).

Нами совместно с Л. М. Губерниевой и К. Н. Мясоедовой при помощи метода «отпечатков пальцев» были подвергнуты сравнению неспецифический γ -глобулин из сывороток неиммунизированных кроликов и два антитела к нему [135]. Антитела против сывороточного альбумина человека и сывороточного альбумина лошади выделялись из сывороток кроликов, одновременно иммунизированных этими белками. Препараты ан-

Близкая картина видна и на электрофорез-хроматограммах гидролизата антител (рис. 3, Б). Значительная часть компонентов гидролизата антител оказалась идентичной компонентам ферментативного гидролизата неспецифических γ -глобулинов. Однако на рисунке видно существование определенных различий между сравниваемыми белками. В гидролизате антител против сывороточного альбумина человека (анти-САЧ) пептид 31 присутствует лишь в виде следов, почти отсутствует в нем и пептид 6, хотя оба эти пептида хорошо выражены в гидролизате неспецифических γ -глобулинов.

Картина, наблюдаемая после разделения пептидов гидролизата второго из изучаемых нами антител — анти-САЛ, несколько отличается от явлений, наблюдаемых после разделения гидролизата анти-САЧ. Пептид 31 на электрофорез-хроматограммах этого антитела отсутствовал вовсе. Что же касается пептида 6, то содержание его в гидролизате анти-САЛ значительно меньше, чем в гидролизате неспецифических γ -глобулинов, но все же несколько больше, чем в гидролизате анти-САЧ.

Полученные данные говорят в пользу того, что полипептидные цепи отдельных антител и неспецифических γ -глобулинов, по-видимому, неидентичны. К подобному же выводу пришел и Д. Гитлин, опубликовавший недавно краткое сообщение по этому вопросу [138]. Осадив кроличьи антитела против различных полисахаридов соответствующими антигенами и подвергнув эти антитела действию трипсина, химо трипсина и пепсина, он получал гидролизаты, в которых электрофорез-хроматографический анализ выявлял значительные различия.

Вывод о различии первичной структуры отдельных антител и неспецифических γ -глобулинов нельзя считать окончательным. Д. Гитлиным опубликовано лишь предварительное сообщение. Недостатком наших исследований является то, что неспецифические γ -глобулины выделялись не из той же сыворотки, из которой выделялись антитела. Необходима дальнейшая работа в этом направлении. Если же полученные нами и Д. Гитлиным данные подтвердятся при исследовании большого количества различных антител, то их можно будет рассматривать как прямое опровержение теории Полинга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее признанным в учении об антителах является положение о наличии в антителе активного центра, обладающего конфигурацией, дополнительной к конфигурации детерминирующей группы антигена.

О причине такого соответствия в настоящий момент нет единого мнения. По мнению Гаурозитца и Полинга, подобное соответствие обусловлено тем, что антиген вмешивается прямо в процесс скручивания полипептидных цепочек глобулина, в результате чего вместо молекул неспецифического γ -глобулина образуются молекулы соответствующего антитела [27, 13, 28]. Признание того, что антиген действует подобно штампу, позволяет понять механизм образования антител против любых, в том числе синтетических, соединений. Отказ от этого положения крайне затрудняет понимание механизма передачи информации от детерминирующей группы антигена к активной группе антитела.

Наряду с этим теория Гаурозитца — Полинга сталкивается с рядом затруднений. Она не объясняет наличия латентного периода, логарифмической фазы нарастания содержания антител, причины более энергичного образования антител при повторной иммунизации. Ей противоречит отсутствие конкурентных отношений между биосинтезом антител и неспецифических γ -глобулинов и между биосинтезом отдельных антител. Наконец,

в самое последнее время нами совместно с Л. М. Губерниевой и К. Н. Мясоедовой [135] и Д. Гитлиным [138] были получены предварительные данные об отличии пептидных цепей отдельных антител и неспецифических γ -глобулинов. Подтверждение этих пока лишь предварительных данных явилось бы прямым опровержением теории Гауровитца — Полинга, во всяком случае, в том виде, в котором она существует сейчас.

Ряд фактов указывает на то, что введение антигена вызывает появление или резкое увеличение количества каких-то биологических структур, обеспечивающих в дальнейшем биосинтез антител. Именно этим, по-видимому, объясняются такие явления, как латентный период (в этот период происходит образование и начальная стадия увеличения количества этих структур), наличие логарифмической фазы (сбусловленной пролиферацией этих структур), более энергичное образование антител при повторной иммунизации (связанное с сохранением в том или другом виде части структур, образовавшихся при первичном стимуле), отсутствие прямых конкурентных отношений между биосинтезом отдельных антител и неспецифических γ -глобулинов.

Признание того, что под влиянием антигена происходит образование или резкое увеличение числа биологических структур, ответственных за биосинтез антител, лежит в основе ряда резко различающихся теорий по вопросу о путях передачи информации от антигена к антителу.

Как мы видели выше, согласно теории «селекций клонов» Барнета, никакой передачи информации от антигена не происходит [22, 23]. Информация, необходимая для образования активной группы антитела, заложена в наследственных механизмах клетки. Антиген лишь активирует пролиферацию этих клеток и повышает интенсивность синтеза ими белка антител.

Теория селекции клонов требует, чтобы в организме животного присутствовало такое количество популяций, образующих антитела клеток, которое соответствовало бы количеству антител, образуемых данным животным. Сторонники этой теории ссылаются на сделанный в 1955 г. Гауровитцем вывод о том, что возможно существование лишь 50 000 различных антител. Автор высказал это мнение на основании вычисления количества возможных комбинаций 20 естественных аминокислот в активном центре антител, состоящем из 3—4 аминокислотных остатков [62]. Телмэдж, приняв ряд ограничений, свел количество возможных типов антител к 5000 [139]. По мнению Ярославца и Кастлера, количество возможных типов антител еще меньше [140]. Однако в обзоре 1960 г. Гауровитц высказывает мнение, что если принять возможность различного свертывания каждой комбинации три- или тетра-пептида, образующего активный центр антител, то можно постулировать существование 1 000 000 и большего количества типов антител [62].

Теория селекции клонов требует, чтобы в организме существовали в течение миллионов лет и передавались из поколения в поколение популяции клеток, способные образовывать антитела против синтетических соединений, которые никогда за всю эволюцию вида не попадали в кровоток особей данного вида. Очень трудно согласиться с этим.

Барнет ряд явлений объясняет тем, что введение антигена эмбриону вызывает подавление роста и элиминацию клеток, образующих соответствующие антитела, а введение антигена взрослому организму вызывает пролиферацию соответствующих клеток и стимуляцию образования антител ими. Однако он не объясняет причины такого различия, а также то, почему антиген у взрослого животного стимулирует образование антител.

Теория селекции клонов исходила из предположения, что одна клетка может синтезировать лишь одно антитело. Это предположение подкрепля-

лось соответствующими опытами на одиночных клетках, которые были проведены сторонниками разбираемой теории [141, 142, 143]. Однако наряду с этими работами появились убедительные данные, указывающие на возможность образования одной клеткой двух видов антител [144, 145]. Признание подобной возможности лишает теорию селекции клонов значительной части ее первоначальной стройности.

Серьезные трудности возникают и в том случае, если отвергнуть идею о наличии предсуществующих механизмов биосинтеза антител и признать, что введение антигена способствует возникновению новых биологических структур, обеспечивающих биосинтез антител, подобно тому, как это делали Барнет и Фенер [34] или Швит и Оуэн [35].

Первая из названных теорий предполагает наличие процесса саморепродукции белков, возможность которого в настоящий момент отвергается. Правда, Барнет в 1950—1956 гг. сделал попытку приблизить эту теорию к современным представлениям о биосинтезе белка, однако, начиная с 1957 г., отказался от разбираемой теории вовсе и стал развивать теорию селекции клонов.

Весьма перспективна теория Швита и Оуэна [35]. Попытка авторов связать синтез антител с появлением в организме измененных нуклеиновых матриц представляет большой интерес. К сожалению, в настоящий момент трудно представить, каким образом информация от антигена передается к антителу в этом случае.

Согласно современным представлениям о биосинтезе белка, матрицей, определяющей строение белка, является высокомолекулярная рибонуклеиновая кислота микросом. Поскольку полинуклеотидная цепь этой матрицы состоит из четырех типов нуклеотидов, а полипептидная цепь белков — из 20 типов аминокислотных остатков, передача информации с матрицы на белок возможна лишь при помощи шифра. Таким шифром, по мнению большинства ученых, работающих в данной области, являются различные способы комбинации четырех нуклеотидов в полинуклеотидной цепи.

На важную роль нуклеиновых кислот в синтезе антител указывают Штерцль и Грубешова, введившие новорожденным крольчатам, еще не способным образовывать антитела, рибонуклеопротеиды и дезоксирибонуклеопротеиды, выделенные из тканей взрослых иммунизированных кроликов. Согласно данным этих исследователей, в крови новорожденных крольчат-реципиентов появлялись соответствующие антитела [146]. К сожалению, подтверждение и дальнейшее развитие этих работ встретилось с серьезными трудностями [76]. Возможно, что наблюдавшийся Штерцлем и Грубешовой эффект связан с распадом комплекса антитела с нуклеиновыми кислотами. Существование подобного комплекса было показано Фельдманом и сотрудниками, которые выделили высокоочищенные рибонуклеопротеиды из селезенки и лимфатических узлов иммунизированных кроликов. В полученных препаратах антитела не обнаруживались, но появлялись в них после обработки препаратов рибонуклеазой [147].

Каким же образом полинуклеотидная матрица начинает синтезировать измененный белок антител?

Вполне мыслимо, что антиген или его детерминирующая группа присоединяется к какому-либо участку нуклеотидной цепочки. В пользу такой возможности говорят данные Гарвея и Кемпбела, установивших, что антиген (сывороточный альбумин быка), введенный кроликам, обнаруживается в течение длительного времени в их печени в виде комплекса с рибонуклеиновой кислотой [63]. Если признать, что введенный антиген или его детерминирующая группа во всех случаях комплексируются с нуклеиновой матрицей (что, конечно, еще совершенно не доказано), то и это не дает возможности понять причину биосинтеза антител. Остается совершенно не-

Заметим, что РНК-матрица выводится из тельной матрицы данного Вряд ли ни. Решиментальнейший про

1. L a n d
- setts
2. B o u
- L o n
3. З и л
4. Г о с т
5. В е с
6. H e i
- 63,
7. L a n
8. B o p
9. I s l i
10. M a
11. R a
12. J o
13. G a
14. B u
15. B u
16. C m
17. B e
18. C o
19. E h
- L e
20. J e
21. T a
22. B u
23. B u
- P
24. G a
25. B
26. A
27. P
28. H
29. G
30. B
31. K
32. T
33. K
34. B
35. S
36. I
- 37.
- 38.
- 39.
- 40.
- 41.
- 42.
- 43.

понятным, почему присоединение антигена к полинуклеотидной цепочке РНК-матрицы приводит к такому изменению шифра, что начинают образовываться молекулы белка, имеющего участок с конфигурацией, дополняющей к конфигурации детерминирующей группы антигена. Решение данного вопроса требует как выяснения механизма участия нуклеиновой матрицы в синтезе белка, так и путей влияния антигена на этот процесс. Вряд ли можно сомневаться в целесообразности работы в этом направлении. Решение проблемы влияния антигена на синтез белка дало бы экспериментатору возможность оказывать направленное воздействие на важнейший процесс, с которым связана жизнь, — на процесс биосинтеза белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Landsteiner K. The specificity of serological reactions Cambridge, Massachusetts Harvard University press, 1946.
2. Boyd W. C. Fundamentals of immunology. Interscience publishers. New York. London, 1956.
3. Зильбер Л. А. Основы иммунологии, 1958.
4. Гостев В. С. Химия специфического иммунитета. М., 1959.
5. Beckett A. H. Angewandte chemie, 1960, 72, 686.
6. Heidelberger M. Lectures on immunochemistry. Tokyo. J. Med. Sci., 1955, 63, 5, 141.
7. Landsteiner K. J. Exper. med. 1942, 75, 269.
8. Борде Ж. Иммунитет, антигены, антитела. М., 1929.
9. Isliker H. Advanc. in prot chem., 1957, 12, 320.
10. Manwaring W. H. J. Immunol, 1930, 19, 155.
11. Ramon G. Revue d'immunologie, 1939, 5, 385.
12. Jordan P. Immuni ätsforsch. exptl. Therap., 1940, 97, 330.
13. Гауровитц Ф. Химия и биология белков. ИЛ, М., 1953.
14. Bussard A. D. Ann. Rev. Microb., 1959, 13, 279.
15. Buchner H. Munch. Med. Wschr., 1893, 40, 480.
16. Смирнов Г. А. Врач, 1896, 17, 825.
17. Berger E., Erlenmeyer H. Z. hyg. Infentionskrakh., 1932, 113, 79.
18. Cohn M., Pappenheimer A. M. J. Immunol, 1949, 63, 291.
19. Ehrlich P. The collected papers of Paul Ehrlich. Pergomon press, New-York, London, 1957.
20. Jerne N. K. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1955, 41, 849.
21. Talmage D. W. Ann. Rev Med., 1957, 8, 239.
22. Burnet F. M. Austral. J. Science, 1957, 20, 67.
23. Burnet F. M. The clonal selection theory of immunity. Cambridge University Press, 1958.
24. Гамалея Н. Ф. Основы иммунологии. М., 1928, 51.
25. Breinl F., Haugowitz F. H. S. Z. physiol. Chem., 1930, 192, 45.
26. Alexander I. Protoplasma, 1931, 14, 296.
27. Pauling L. J. Amer. Chem. Soc., 1940, 62, 2643.
28. Haugowitz F. Biol. Revs., 1952, 27, 247.
29. Гурвич А. Е., Карсаяевская Н. Г. Биохимия, 1956, 21, 746.
30. Вязов О. Е. Успехи современной биологии, 1952, 33, 47.
31. Капланский С. Я. В кн.: Актуальные вопросы современной биохимии. Биохимия белков. Т. I. М., 1959, 132.
32. Tyler A. Sixth growth Symposium, 1947.
33. Karush F. Trans N. Y. Acad. Sc. Ser. II, 1958, 20, 581.
34. Burnet F., Fenner F. The production of antibodies. Macinillan, Melbourne, 1949.
35. Sweet R. S., Owen R. D. J. Cellular a. Comar Physiol., 1957, 50, Suppl. No. 1, 199.
36. Monod J. В кн.: Cellular a humoral aspects of hypersensitive states. A. Hoerber—Hazper book. New York, 1959, 628.
37. Boyden S. Nature, 1960, 185, 724.
38. Поллинг Л. В. кн. Возникновение жизни на земле. М., 1959, 222.
39. Pauling L., Campbell D. H. J. Exptl. Med., 1942, 76, 211.
40. Vason D. Arch. intern. Med., 1943, 72, 581.
41. Kryshanski W. N. Centralbl. Bact. Paras. Infekt., 1929, 110, 1.
42. Кузин А. М., Невраева Н. А., Биохимия, 1947, 12, 49.
43. Haugowitz F., Schwerin P., Tunc S. Arch. Biochem., 1946, 11, 515.

44. Haurowitz F., Tekman S. Comp. rend Soc. Turque Sci. nat., 1947, 13, 81.
45. Hrubesova M. Csl. Mikrobiol., 1957, 2, 10.
46. Loiseleur J. C. r. Acad. sci., 1958, 246, 1114.
47. Gros P., Coursaget J., Macheboeuf M. Bul. Soc. Chim. Biol., 1952, 34, 1070.
48. Green H., Anker H. S. Bioch. Biophys acta, 1954, 13, 365.
49. Гурвич А. Е. Вопросы медицинской химии, 1955, 1, 169.
50. Гурвич А. Е. Смирнова Н. П. Биохимия, 1957, 22, 626.
51. Humphrey J. H., Sulitzeanu B. D. Bioch. J., 1958, 68, 145.
52. Coons A., Leduc E., Kaplan M. J. Exptl. Med., 1951, 93, 173.
53. Coons A., Leduc E., Connolly J. J. Exptl. Med., 1955, 102, 61.
54. Гурвич А. Е. Успехи современной биологии, 1954, 37, 94.
55. Sorokin E. В кн.: Mechanisms of Antibody Formation. Prague., 1960, 61—67.
56. Haurowitz F., Crampton C. J. Immunology, 1952, 68, 73.
57. Coons A., Annual Rev. Microbiol., 1954, 333.
58. Haurowitz F., Reller H., Walter H. J. Immunology., 1955, 75, 417.
59. Fields M., Raymond L. J. Immunol., 1952, 69, 581.
60. Heidelberger M. В кн.: The nature and significance of the antibody response., 1953, 90.
61. Stark O. K. J. Immunol., 1955, 74, 130.
62. Haurowitz F. Annual. rev. biochem., 1960, 29, 609.
63. Garvey J., Campbell D. J. Exptl. med., 1957, 105, 361.
64. McMaster P., Kruse H. J. Exptl. med. 1951, 94, 323.
65. Dick G. W. A., Gree F. L. Trans Roy Soc. Trop. Med. Hyd., 1952, 46, 449.
66. Peterson J. C., Christie A., Williams W. C. Am. J. Diseases. child., 1955, 89, 295.
67. Weigle O. В кн.: Mechanisms of Antibody Formation. Proceed. Symposium., Prague, 1960, 283.
68. McMaster P., Hudack S. J. Exptl. Med., 1935, 61, 785.
69. Harris S., Harris T. J. Immunol., 1949, 61, 193.
70. Учитель И. Я. Успехи современной биологии, 1957, 48, 180.
71. Учитель И. Я., Коникова А. С. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1955, 40, 12, 35.
72. Taliaferro W., Talmage D. J. Infect. Diseases., 1955, 97, 88.
73. Taliaferro W., Taliaferro L. G. Y. Infect. Diseases., 1957, 101, 252.
74. Stavitsky A. B., Feder. Proc., 1956, 15, 615.
75. Dixon F. J., Maurer P. H., Weigle W. O., Deichmiller M. P. J. exptl. med., 1956, 103, 425.
76. Штерцль Я. Успехи современной биологии, 1959, 48, 356.
77. Райский М. Харьковский медицинский журнал, 1915, 20, 135.
78. Райский М. Харьковский медицинский журнал, 1915, 20, 169.
79. Здродовский П. Ф. Проблема реактивности в учении об инфекции и иммунитете. М., 1950.
80. Иоффе В. И. В кн.: Экспериментальная и клиническая иммунология. Л. ИЭМ, 1959, 5.
81. Glenny A., Sudmersen H. J. Hyg., 1921, 20, 176.
82. Garvey J. S., Campbell D. H. J. exptl. Med., 1959, 110, 355.
83. Stavitsky A. B., Wolf B. Bioch. biophys. acta. 1958, 27, 4.
84. Cheng H. F., Haurowitz F. Federation Proc., 1957, 16, 409.
85. Richter M., Haurowitz F. J. Immunol, 1960, 84, 123.
86. Barr M., Glenny A. T. J. Hyg., 1945, 44, 135.
87. Holt L. B. Developepments in diphtheria prophylaxis. London, 1950.
88. Гурвич А. Е. В кн.: Всесоюзная научно-техническая конференция по применению радиоактивных и стабильных изотопов в народном хозяйстве и науке. 1957. Труды. М., 1958, 55.
89. Tiselius A., Kabat E. J. exper. Med., 1939, 69, 119.
90. Scheer J., Lagsdin J., Wyckoff R. J. Immunol, 1941, 41, 209.
91. Gross P., Gitlin D., Janeway C. New Engl. J. Med., 1959, 260, 221.
92. Wuhrmann F., Wunderly Ch. Die Bluteiweisskörper des Menschen. Basel Stuttgart, 1957.
93. Tiselius A. Biochem. J., 1937, 31, 1464.
94. Larson D., Tomlinson L. J. Lab. Clin. Med., 1952, 39, 129.
95. Hudgins P. C., Cumminge M. M., Patnode R. A. Proc. Soc. Exptl. Biol. a Med., 1956, 92, 75.
96. Richter G. W. J. exptl. Med., 1952, 96, 331.
97. Flick J., Ketterer S., Wohl M., Waife S. Amer. J. Med. Sci., 1951, 221, 71.
98. Dimopoulos G. T., Fellowes O. N. J. Immunol., 1958, 81, 199.

99. Janeway C. A., Gitlin D. Adv. in pediatr., 1957, 9, 65.
100. Gross A. M., Gitlin D., Janeway C. A. New England J. Med., 1959, 260, 170.
101. Нечаева А. С., Пономарева Н. А. Практическое руководство по производству γ -глобулинов. М., 1956.
102. Cann J. R., Brown R. A., Kirkwood J. G., Sturgeon P., Clarke D. W. J. Immun., 1952, 68, 243.
103. Cann J. R., Loveless M. H. J. Immun., 1954, 72, 270.
104. Aladiem F., MacLaren W., Campbell D. Science, 1957, 125, 692.
105. Ойвин В. И., Корецкая Л. С. Архив патологии, 1957, 19, 11, 46.
106. Ойвин И. А., Ойвин В. И., Смоличев Е. П. В кн.: Труды Душанбеского медицинского института, 1959, 37, 5.
107. Porter R. R. Folia biologica, 1958, 4, 310.
108. Kuhns W. Am. J. Med., 1956, 20, 251.
109. Heidelberger M., Pedersen K. O. J. Exptl. Med., 1937, 65, 393.
110. Kabat E. A. J. Exptl. Med., 1939, 69, 103.
111. Stelos P. J. Immunol., 1956, 77, 396.
112. Weber R. Vox Sanguinis, 1956, 1, 37.
113. Filitti-Wurmser S., Aubel Lesure G., Wurmser R. J. chim. phys., 1953, 50, 236.
114. Грабарь П. Биохимия, 1957, 22, 49.
115. Slater R. J. Arch. Bioch. a Biophys., 1955, 59, 33.
116. Thorbecke G. J., Gordon H. A., Westmann B., Wagner M., Reyniers J. A. J. infect. Dis., 1957, 101, 237.
117. Westmann B. S. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1959, 78, 254.
118. Gustafsson B., Laurell C. J. Exptl. Med., 1958, 108, 251.
119. Mayer M. Ann. rev. bioch., 1951, 20, 415.
120. Smith E. L., Jager B. V. Annual Review. microb., 1952, 6, 207.
121. Porter R. R. Biochem. J., 1950, 46, 473.
122. Orlans E. S. Nature, 1955, 175, 728.
123. McFadden M. L., Smith E. L. J. Biol. Chem., 1955, 214, 185.
124. Резниченко М. С., Моисеева В. П., Полотнова Л. И., Тукачинский С. Е. Доклады АН СССР, 1959, 124, 1339.
125. McFadden M. L., Smith E. L. J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 2784.
126. McFadden M. L., Smith E. L. J. Biol. Chem., 1955, 216, 621.
127. Lay W. P., Polglase W. Y., Can. J. Biochem. Physiol., 1957, 35, 39.
128. Putman F. W. J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 2785.
129. Press M. E., Porter R. R. Nature, 1960, 187, 59.
130. Smith E., McFadden M., Stockell A. Buettner Janusch V. J. Biol. Chem., 1955, 214, 197.
131. Ingram V. M. Biochem. et Bioph. Acta, 1958, 28, 539.
132. Энгельгард В. А. Некоторые проблемы современной биохимии. М., 1959.
133. Орехович В. Н. Актуальные вопросы современной биохимии. Т. I. Биохимия белков. М., 1959, 5.
134. Anfinsen C. B., Aqvist S., Cooke J. P., Johnson B. J. Biol. Chem., 1959, 234, 1118.
135. Гурвич А. Е., Губерниева Л. М., Мясоедова К. Н. Биохимия, 1961, 26, 468.
136. Гурвич А. Е., Капнер Р. Б., Незлин Р. С. Биохимия, 1959, 24, 142.
137. Гурвич А. Е. Извлечение чистых антител из сыворотки при помощи антигенов, фиксированных на целлюлозном порошке. Академия медицинских наук СССР, Институт биологической и медицинской химии. М., 1960.
138. Gitlin D. Feaer proc., 1960, 19, 199.
139. Talmage D. В кн.: Sympos. mol. Biol. Chicago, 1958.
140. Ярослав Б. и Кастлер Г. В кн.: Теория информации в биологии ИЛ. М., 1960.
141. Nossal G. J. V., Lederberg J. Nature, 1958, 180, 1419.
142. Nossal G. L. V. Brit J. Exptl. pathol., 1958, 39, 544.
143. White R. G. Nature, 1958, 182, 1383.
144. Lennox E. S. J. Cellul. Comp. Phys. 52, Suppl., 1958, 63.
145. Attaroli G., Lennox E., Cohn M., Horibata K. Abstr. B-1 Biophys. Soc. 2-nd Meeting. (Pittsburgh, Pa., 1959).
146. Sterzl J., Hruběšová M. Folia biol. (ceskosl.), 1956, 2, 21.
147. Feldman M., Elson D., Globerson A. Nature, 1960, 185, 317.

ГЛАВА VI

О БЕЛКАХ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

В. А. Белицер, Е. Л. Ходорова и Т. В. Варецкая

В сложной цепи реакций свертывания крови сравнительно хорошо известны последние звенья: действие тромбина на фибриноген и образование фибрина. Имеются некоторые сведения о тромбине и его предшественнике — протромбине. Что же касается факторов, прямо или косвенно ответственных за переход протромбина в тромбин, то их изучение еще находится в начальной стадии.

Агентом, непосредственно действующим на протромбин, по всей вероятности, является специфический фермент протромбиназа, иначе называемый «активный тромбопластин». Путь образования этого фермента в крови поразительно сложен. Взаимодействия многочисленных участвующих здесь факторов в настоящее время неясны. Имеющиеся данные позволяют построить различные гипотетические схемы [1].

В системе факторов, образующих протромбиназу, вероятно, имеется несколько белков-ферментов. Борном обнаружены интересные, очевидно ферментативные, изменения состава фосфатных фракций, сопровождающие свертывание рекальцифицированной плазмы, богатой тромбоцитами [2]. Наиболее существенно увеличение количества фосфопротенинов плазмы за счет АТФ тромбоцитов и фосфолипидов самой плазмы. В настоящее время, однако, остается неясным, какова связь между этими изменениями и процессом свертывания.

ПРОТЕИНАЗЫ В СИСТЕМЕ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Как известно, тромбин является протеиназой, но, кроме того, протеолитической активностью обладают и некоторые другие белки, участвующие в процессе свертывания.

Арскотт, Коппель и Ольвин [3], а также Мейлостоун [4, 5, 6] сообщили о способности тромбопластина крови расщеплять метиловый эфир тозил-аргинина, представляющий собой, как известно, синтетический субстрат для протеиназ типа трипсина. В нашей лаборатории Т. В. Варецкой получены следующие данные. Тромбопластин легких, очищенный методом дифференциального центрифугирования, свободен от ферментов, расщепляющих метиловый эфир тозил-аргинина (сокращенно МЭТА). То же можно сказать о препаратах фактора V (проакцеллерина). Наоборот, препараты конвертина (фактора VII) имеют отчетливо выраженную способность расщеплять МЭТА. Проверка показала, что наши препараты конвертина практически лишены тромбина и пламина, и, следовательно, гидролиз МЭТА

должен быть отнесен за счет фактора, отличного от этих хорошо известных ферментов. Любопытной особенностью конвертиновых препаратов является то, что они катализируют расщепление МЭТА в фосфатном, но не в боратном буфере, содержащем 0,01 М хлористого кальция. Тромбин расщепляет МЭТА в той и другой среде.

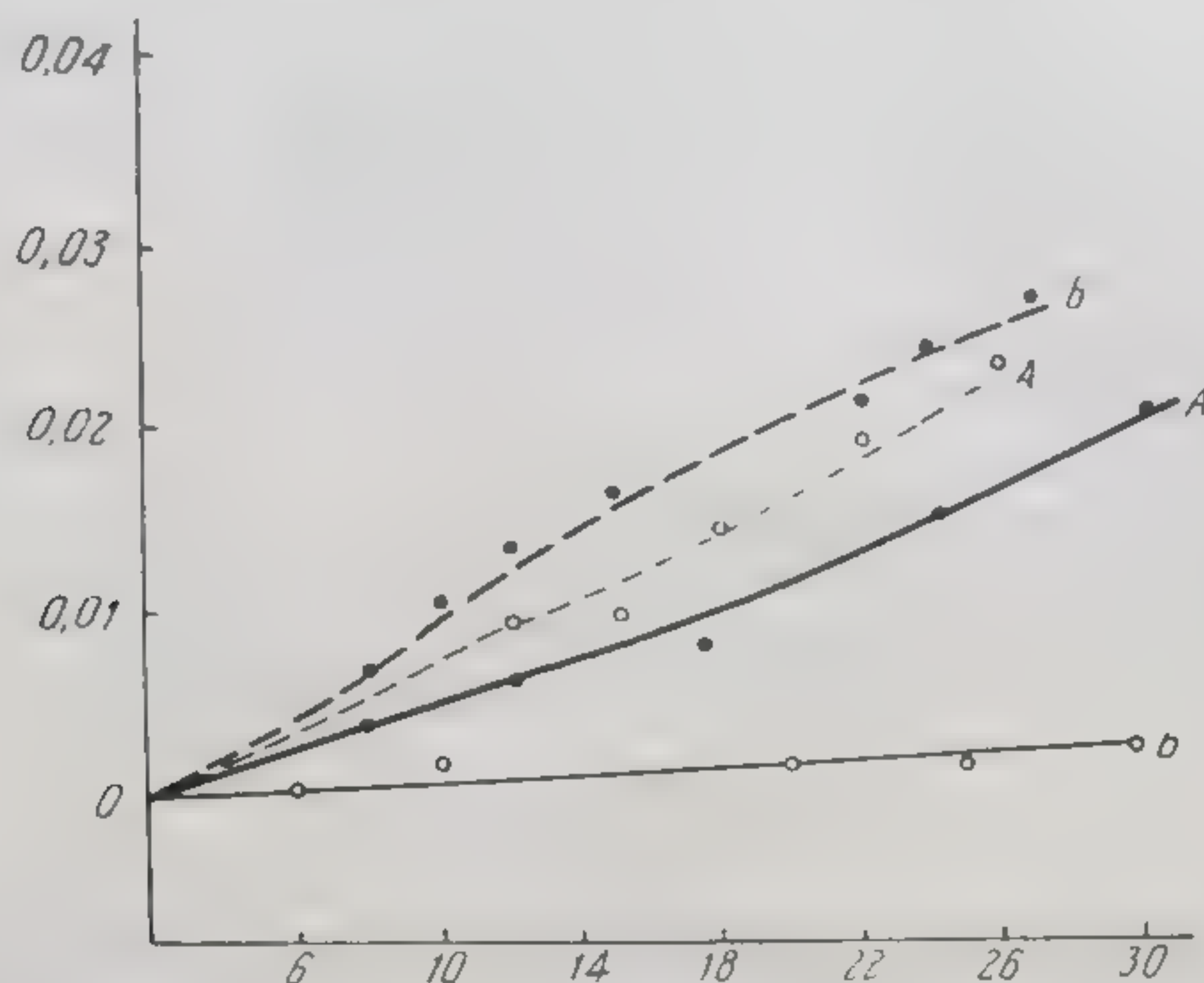


Рис. 1. Расщепление МЭТА конвертином и тромбином.

На оси ординат: оптическая плотность при 247 мμ; на оси абсцисс: время инкубации (в минутах); — действие конвертина; — — — действие тромбина; A — фосфатный буфер; B — боратный буфер + CaCl_2 .

На рис. 1 показан ход расщепления МЭТА, регистрируемого по увеличению оптической плотности при 247 мμ. Ферментативная функция препаратов конвертина, возможно, имеет прямое отношение к механизму свертывания крови. Эту функцию мы надеемся изучить подробнее.

Ниже мы остановимся на некоторых вопросах, касающихся протромбина, тромбина, фибриногена и фибрина.

ПРОТРОМБИН И ТРОМБИН

Протромбин является белком с молекулярным весом 68 000. В разбавленных растворах он диссоциирует на частицы с весом 34 000. В составе протромбина обнаружено 18 различных аминокислот, свойственных и другим белкам.

Превращение протромбина в тромбин может быть осуществлено при помощи трипсина, автокаталитическим путем (в присутствии высоких концентраций цитрата) и, наконец, сложной системой биологических активаторов.

Выделить протромбин в высокоочищенном состоянии впервые удалось Сигерсу [7]. Итогом его многолетней работы явился препаративный метод, включающий изоэлектрическое осаждение, адсорбцию на гидрате окиси магния и фракционирование высаливанием. Такой же степени очистки, судя по удельной активности, достигали при применении хроматографии на колонках с амберлитом RC-50 [8] ДЕАЕ-целлюлозы [9]. В Гарвардском университете группа сотрудников белкового центра воспользовалась при выделении протромбина сульфатом бария, который довольно специфически адсорбирует протромбин [10, 11]. Однако, насколько можно судить по литературе, полученные препараты в отношении чистоты значительно уступали препаратам Сигерса.

В нашей лаборатории также был использован сульфат бария, служивший адсорбентом на первом этапе выделения протромбина из оксалатной плазмы [12, 13]. Новая схема получения такова: (рис. 2).

Первая порция адсорбата, полученная с небольшим количеством сульфата бария, отбрасывалась, так как она оказалась богатой примесями. При этом терялся примерно 5% протромбина. Зато после этого удается получить адсорбат, богатый протромбином, что облегчает дальнейшую очистку. Адсорбат промывается 0,1 М щавелевокислым натрием, 0,006 М лимонно-

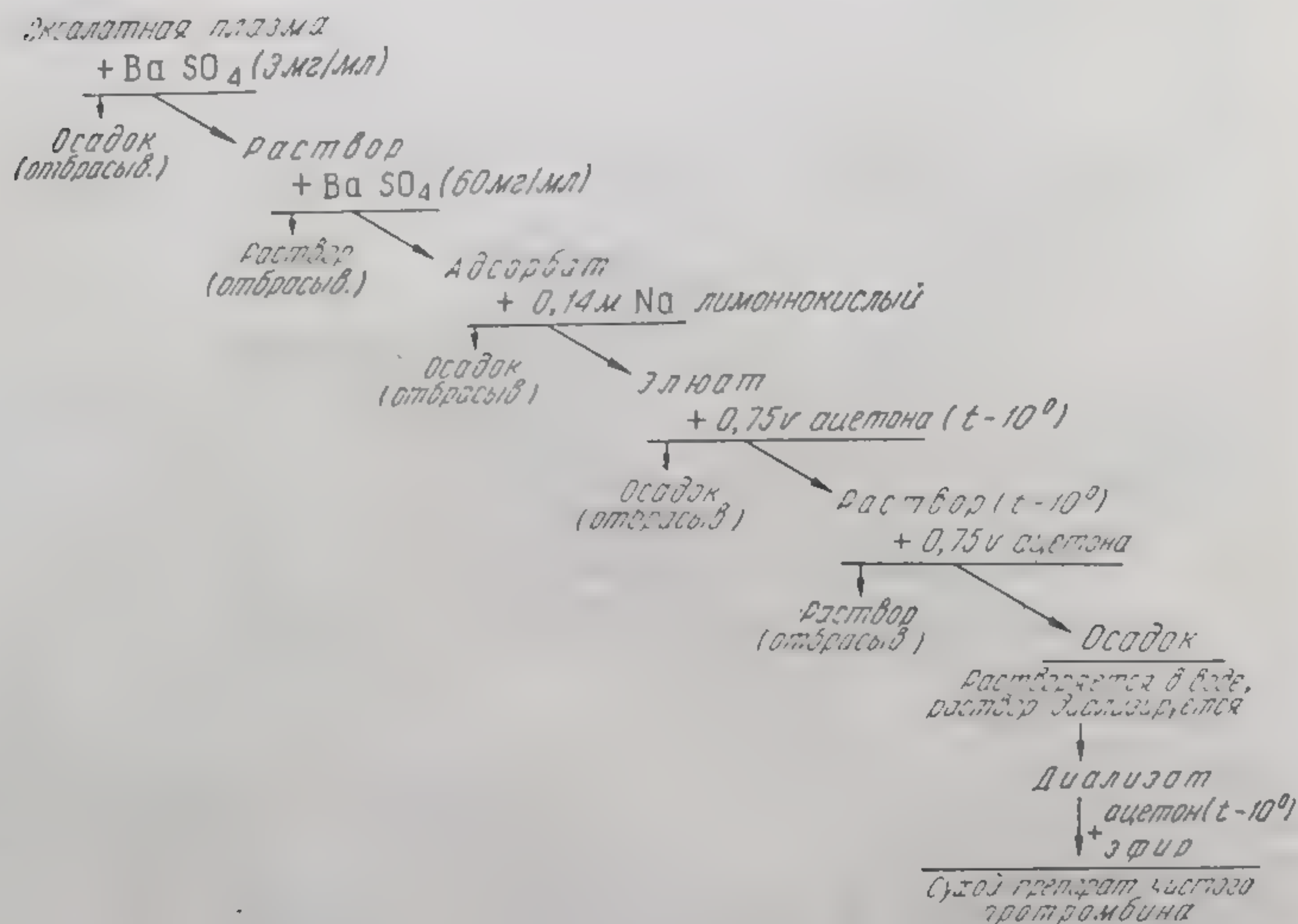


Рис. 2. Схема получения очищенного протромбина.

кислым натрием и элюируется 0,14 М лимоннокислым натрием. Этот элюат далее фракционируется ацетоном при низкой температуре. Фракция 43—60% ацетона содержит чистый протромбин со специфической активностью около 2000 единиц на 1 мг белка. Для хранения очищенный протромбин может быть путем диализа освобожден от большей части содержащейся в нем соли и высушен ацетоном и эфиром при температуре около -10° . Показателями чистоты полученных препаратов наряду с высокой специфической активностью является однородность при электрофорезе и наличие единственной N-концевой аминокислоты — аланина.

Тромбин получен в относительно чистом виде [14]. Молекулярный вес этого белка точно не определен. По Гладнеру с сотрудниками [15], молекулярный вес субъединицы равен 13 700. В растворе, по-видимому, имеется тетрамер с молекулярным весом 55 000. Тромбин представляет собой протеолитический фермент, который, подобно трипсину, расщепляет пептидные связи, образованные карбоксильными группами аминокислот лизина и аргинина. Нативные белки очень резистентны к тромбину; в фибриногене тромбин действует только на определенные связи аргинин-глицин. К вопросу о специфичности тромбина мы вернемся при рассмотрении реакции превращения фибриногена в фибрин.

В нашей лаборатории также был использован сульфат бария, служивший адсорбентом на первом этапе выделения протромбина из оксалатной плазмы [12, 13]. Новая схема получения такова: (рис. 2).

Первая порция адсорбата, полученная с небольшим количеством сульфата бария, отбрасывалась, так как она оказалась богатой примесями. При этом терялось примерно 5% протромбина. Зато после этого удается получить адсорбат, богатый протромбином, что облегчает дальнейшую очистку. Адсорбат промывается 0,1 М щавелевокислым натрием, 0,006 М лимонно-

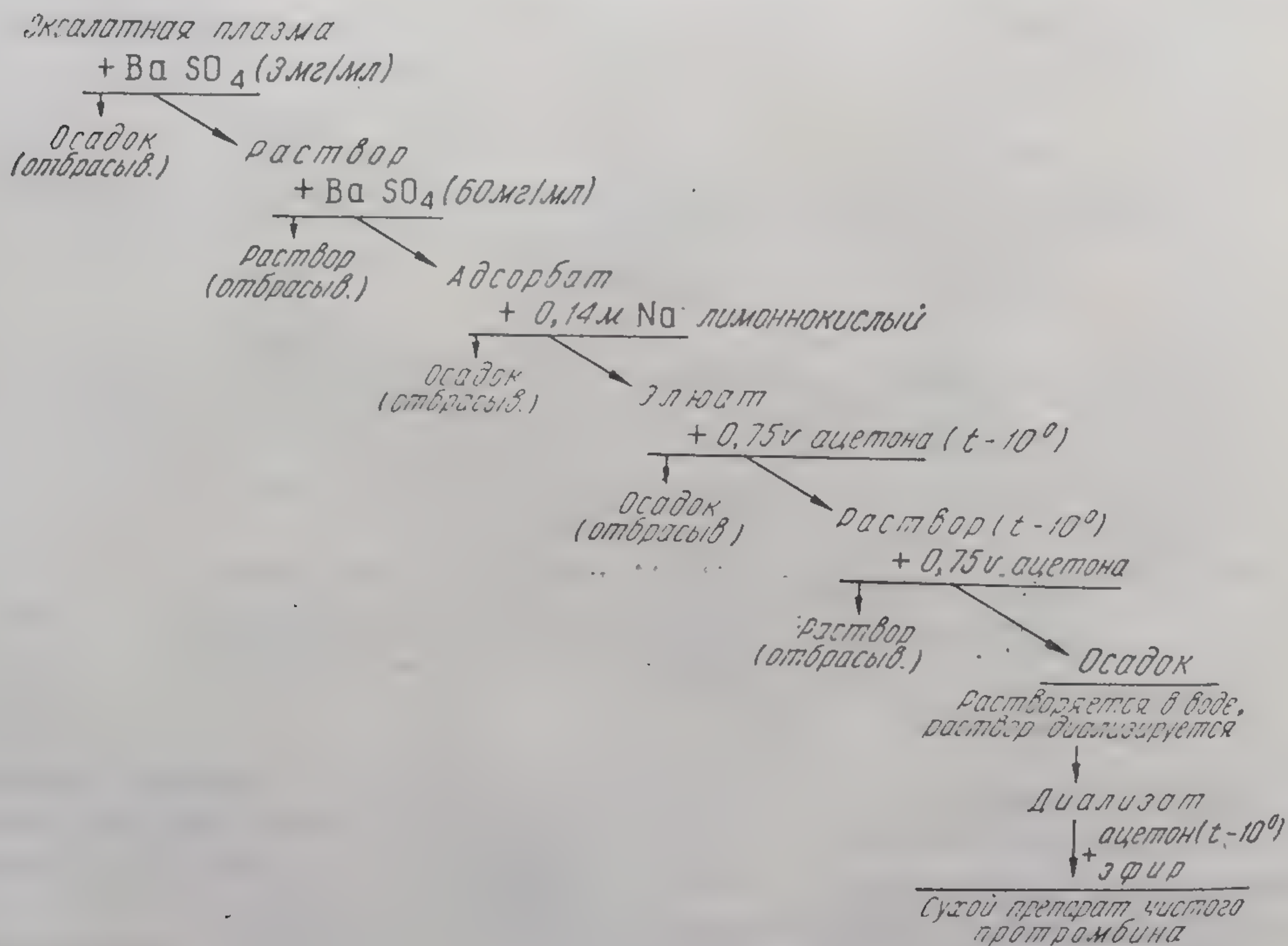


Рис. 2. Схема получения очищенного протромбина.

кислым натрием и элюируется 0,14 М лимоннокислым натрием. Этот элюат далее фракционируется ацетоном при низкой температуре. Фракция 43—50% ацетона содержит чистый протромбин со специфической активностью около 2000 единиц на 1 мг белка. Для хранения очищенный протромбин может быть путем диализа освобожден от большей части содержащейся в нем соли и высушен ацетоном и эфиром при температуре около -10°. Пока-

Тромбин принадлежит к числу неустойчивых белков. В противоположность трипсину он очень быстро инактивируется при кислой реакции. Количественное определение тромбина, проводимое по свертыванию фибриногена при стандартных условиях, встречает большие трудности. Получаются плохо воспроизводимые колеблющиеся результаты. Т. В. Васнецкой, А. Л. Лосевой и В. И. Яценко [16] причины дефектов удалось выяснить и в основном устранить. Невоспроизводимость определений зачастую возникает как следствие различий между отдельными образцами фибриногена. В результате проведенных исследований разработаны приемы получения препаратов фибриногена, имеющих постоянную скорость свертывания. Основная причина колебаний получаемых результатов заключается в быстрой инактивации разбавленных растворов тромбина. Эффективным стабилизатором тромбина оказался 0,1% раствор яичного альбумина. Этот раствор мы использовали при проведении тестов. Существенная инактивация тромбина в результате контакта со стеклом предотвращалась применением силиконизированных пробирок как для приготовления разбавленных растворов тромбина, так и для проведения тестов свертывания.

ФИБРИНОГЕН

Фибриноген отличается от других белков плазмы крови повышенной склонностью высаливаться и осаждаться спиртом или эфиром; это облегчает задачу его очистки. Критерием чистоты фибриногена наряду с электрофоретической и седиментационной однородностью является полнота превращения в фибрин под влиянием тромбина. Это превращение специфично и является наиболее важным показателем чистоты препарата. Многие современные методы выделения чистого фибриногена сводятся к дальнейшей обработке фракции I (по Кону) белков плазмы крови путем дополнительного фракционирования спиртом, солями, глицином [17, 18, 19]. В нашей лаборатории разработан удобный метод получения фибриногена [20, 21]: плазму сперва адсорбируют сульфатом бария для удаления протромбина и некоторых других участников свертывания крови. Затем производят подщелочение глициновым буфером до pH 8,5 и вносят сульфат натрия до концентрации 5,5%. Выпавшую порцию фибриногена отбрасывают, так как она загрязнена веществами, постепенно изменяющими этот белок и снижающими устойчивость его растворов. Фибриноген, выпадающий при дальнейшем повышении концентрации сульфата натрия до 8,5%, собирают и переосаждают той же солью. Дальнейшее переосаждение проводят в присутствии фосфатного буфера pH 6,5. Выделенный таким путем белок при действии тромбина на 96—98% превращается в нерастворимый фибрин (определение по оптической плотности при 280 mμ). Наши препараты фибриногена относятся к числу наиболее чистых.

Препараты фибриногена с высокой специфической свертываемостью обнаруживают наличие двух видов N-концевых аминокислот. Для бычьего фибриногена такими аминокислотами являются тирозин и глютаминовая кислота, что при помощи фенилизотиоцианатной методики подтверждено К. И. Котковой и для наших препаратов. Другие N-концевые аминокислоты отсутствуют.

Следует отметить, что препараты фибриногена, полученные разными способами, несмотря на высокую степень чистоты, различаются по физико-химическим свойствам. Особенно широко варьирует растворимость. В ряде работ имеются указания на плохую растворимость чистого фибриногена [22]. Даже при оптимальной концентрации хлористого натрия с трудом удается получить 3% или даже 1% растворы фибриногена. Приведенным выше методом получают 5—7% растворы фибриногена, не желатинизирую-

щиеся при хранении в холодильнике. Какие именно моменты препаративной методики определяют ту или иную растворимость препаратов фибриногена — в настоящее время неизвестно.

Молекулярный вес фибриногена в определениях разных авторов не оказался постоянной величиной. Для фибриногена человека приводятся молекулярные веса от 340 000 до 700 000, для фибриногена быка — от 330 000 до 540 000 [23]. Есть основания считать более правильными низкие величины (около 300 000). Пользуясь осмометрическим методом, Е. Л. Ходорова определила молекулярный вес фибриногена в растворах, содержащих мочевину [20]. Концентрации последней варьировали от 200 до 700 мг/мл. Молекулярный вес фибриногена в присутствии мочевины оказался пониженным примерно вдвое: он составлял около 150 000, что позволяет говорить о диссоциации молекул фибриногена на две субъединицы. В пределах указанных концентраций мочевины молекулярный вес фибри-

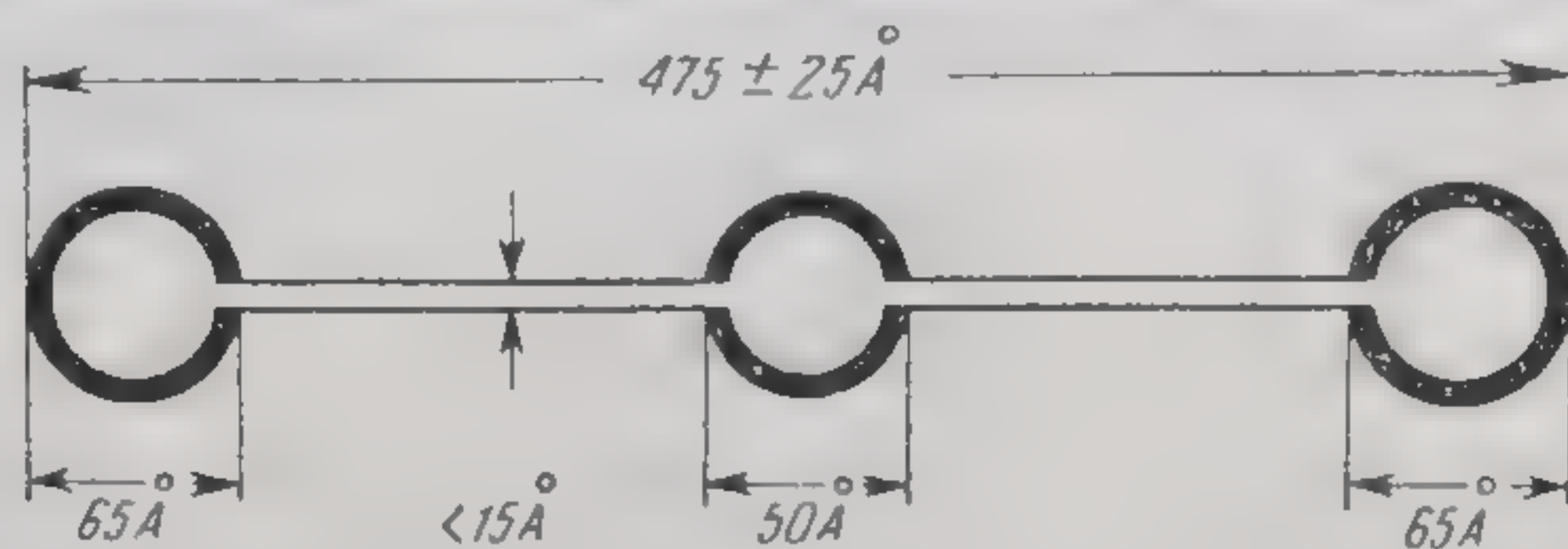


Рис. 3. Схема строения молекулы фибриногена (по Холлу и Слейтору).

ногена практически не изменяется, хотя при низких концентрациях (200—300 мг/мл) белок остается нативным, а при более высоких — денатурируется.

Очевидно, в молекуле фибриногена имеются субъединицы, слабо связанные между собой; они диссоциируют даже при неденатурирующих, умеренных воздействиях мочевины.

Представления о форме молекул фибриногена были неопределенными, пока они базировались на гидродинамических свойствах и допущении об эллипсоидности частиц белка. Соотношения осей частицы оценивались различными авторами далеко не одинаково, приводились такие величины, как 3 и 20 [23]. Значительный успех был недавно достигнут при помощи электронной микроскопии. Холл и Слейтор [24] показали, что молекула фибриногена образована тремя линейно соединенными узелками (глобулами). Периферические узелки крупнее среднего (рис. 3).

Структура, соединяющая узелки, неразличима в электронном микроскопе; по-видимому, это очень тонкий стержень. Кроме цельных молекул фибриногена — триад, в электронном микроскопе обнаруживаются диады — частицы, лишенные среднего узелка, а также монады — изолированные глобулярные частицы. Диады и монады, вероятно, образуются из триад за счет отщепления среднего узелка. Это предположение подтверждается тем, что в образце чистого фибриногена Холл и Слейтор нашли одинаковое количество диад и монад. Распад триад происходит, по всей вероятности, в процессе высушивания препарата при его подготовке для исследования.

Напрашивается сопоставление новых данных, полученных с помощью электронного микроскопа, с результатами определений молекулярного веса фибриногена в присутствии мочевины. В обоих случаях обнаружен распад молекулы фибриногена на две части. Молекулярный вес продуктов диссоциации — 150 000 — определяется осмометрически и является средним мо-

лекулярным весом частицы. Он, следовательно, вполне совместим с предположением о диссоциации молекулы фибриногена на две неравные части — диад и монад. Таким образом, представляется вероятным, что под влиянием мочевины, как и при высушивании, в фибриногене разрывается одна и та же непрочная связь.

Из предыдущего следует, что фибриноген — это индивидуальный белок с характерной морфологией молекулы и, судя по данным о концевых аминокислотах, с определенной первичной химической структурой. Вместе с тем фибриноген является белком с четко выраженной микрогетерогенностью. В ряде работ сообщалось о наличии в плазме нерастворимого на холоду «криоглобулина», который, как теперь стало вероятным, по крайней мере в части случаев, представлял собой несколько модифицированный фибриноген. Моррисон выделил из плазмы богатую фибриногеном белковую фракцию, отличающуюся повышенной высаливаемостью, плохой растворимостью при низкой температуре и способностью ускорять осаждение эритроцитов — повышать РОЭ [25]. Наличие холодонерастворимой фракции в препаратах чистого фибриногена было показано Т. В. Варецкой [21]. Она нашла, что из предварительно разбавленного (0,5—0,7%) раствора фибриногена при температуре, близкой к 0°, часть белка осаждается. При нагревании осадок растворяется. Если выделить фибриноген, оставшийся в растворе после осаждения холодонерастворимой формы, а затем повторить разбавление и охлаждение, то дополнительно осаждается небольшое количество белка. После удаления нового осадка остается фибриноген, полностью растворимый при низкой температуре независимо от разбавления. С другой стороны, выпавший на холоду фибриноген после выделения и растворения при комнатной температуре оказывается чрезвычайно чувствительным к понижению температуры; он выпадает как в концентрированных, так и в разбавленных растворах.

Таким образом, исходный фибриноген можно разделить на две фракции: трудно растворимую (ТФ) и легко растворимую (ЛФ). ТФ составляет примерно 10—15% общего фибриногена в чистом препарате. В растворе ТФ дает большую мутность, чем ЛФ, высаливается при более низких концентрациях солей и быстрее свертывается тромбином. Вместе с тем обе фракции имеют одинаковый процент свертываемого тромбином белка, практически не различаются по удельному оптическому вращению, характеристической вязкости и содержанию углеводов.

Разделение исходного фибриногена на фракции происходит только в разбавленных растворах. В более концентрированных растворах молекулы фибриногена обеих фракций, очевидно, сильно взаимодействуют между собой, причем ЛФ мешает ТФ осаждаться при низкой температуре. В разбавленных растворах, когда межмолекулярные взаимодействия ослаблены и молекулы более «свободны», проявляется предпочтительное взаимодействие между частицами ТФ, что и приводит к осаждению. Действие ЛФ, способствующее растворению ТФ, удается наблюдать, если прибавить концентрированный раствор ЛФ к раствору ТФ. В этом случае при охлаждении ТФ не выпадает. Другие белки — яичный альбумин и сывороточный альбумин, как показали опыты, не способствуют растворению ТФ. Сильное межмолекулярное взаимодействие, обеспечивающее растворимость ТФ, очевидно, специфично, свойственно ЛФ, но не белкам вообще.

Сущность структурных различий между ТФ и ЛФ неизвестна. Мы предполагаем, что в молекулах ТФ полипептидные цепи свернуты так, что поверхностно расположенные полярные группы оказываются в позициях, особо благоприятных для межмолекулярных взаимодействий. По данным Хартли и Во [26], о которых будет упомянуто ниже, характерные различия растворимости между отдельными фракциями фибриногена стойко удерживаются.

живаются, не теряясь даже при обратимой денатурации. Это дает основание предполагать, что структурные особенности фракций закреплены благодаря перестановке S — S связей в молекуле.

Изучая растворимость фибриногена, Хартли и Во установили, что этот белок гетерогенен, причем соотношение легко и трудно растворимой части меняется в зависимости от условий среды. Из каждого препарата фибриногена удавалось получать образцы с большим и стабильным различием в отношении растворимости. Интерпретируя эти данные, Хартли и Во высказали предположение о наличии в препаратах фибриногена бесчисленного множества структурных вариантов с широким спектром растворимостей. Однако имеется альтернативное и, как нам кажется, более вероятное объяснение. Согласно уже упомянутой работе Т. В. Варецкой, частицы фибриногена сильно взаимодействуют между собой. Поэтому при установлении равновесия между твердой фазой и раствором существенную роль может играть сорастворяющее действие ЛФ на ТФ. Если, например, условия среды изменены в сторону, благоприятную для растворения (повышение ионной силы или pH), то не только повышается порог растворимости двух фракций — ЛФ и ТФ, но и возрастает растворяющий эффект ЛФ, а следовательно, меняется соотношение между легко и трудно растворимыми долями белка. Таким образом, фактические данные Хартли и Во можно объяснить, не прибегая к предположению об очень большом числе структурных вариантов. Возможно, конечно, что количество структурных форм фибриногена больше двух, но все же не так велико, как думают указанные авторы.

ПРЕВРАЩЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА В ФИБРИН

Процесс превращения фибриногена в фибрин описан нами в докладе, опубликованном в первом томе «Актуальные вопросы современной биохимии». Сейчас мы позволим себе затронуть лишь отдельные вопросы, приобретающие особый интерес в связи с новыми работами.

Превращая фибриноген в фибрин-мономер, тромбин, как известно, отщепляет от молекулы фибриногена пептиды двух видов: фибрин-пептиды А и Б. Подобно пептиду, отщепляемому при активации трипсина, фибрин-пептиды имеют выраженные кислотные свойства — богаты анионными карбоксильными группами. В молекуле фибриногена участки полипептидных цепей, подлежащие отщеплению в виде фибрин-пептидов, вряд ли находятся в спирально свернутом состоянии ввиду обилия одноименных электрических зарядов.

Вероятно, они «распластаны» на белковой молекуле в конфигурации, обеспечивающей взаимодействие анионных групп с наибольшим количеством катионных групп других участков полипептидных цепей. Можно предполагать, что именно такое положение обеспечивает полную доступность определенных участков пептидных цепей для тромбина и быстрое отщепление фибрин-пептидов. Экспериментальным доводом в пользу неспиральности участков, соответствующих фибрин-пептидам в молекуле фибриногена, может служить отсутствие изменения оптического вращения при превращении фибриногена в фибрин-мономер (и далее в фибрин), что было установлено Е. Л. Ходоровой [27] и позже Михали [28].

По своему размеру и химическому строению фибрин-пептиды в свободном состоянии не могут иметь спиральной конфигурации; если бы они были спирализованы, находясь в составе молекулы фибриногена, то при отщеплении должно было бы произойти их разворачивание, что сопровождалось бы увеличением отрицательного оптического вращения.

Тромбин расщепляет в фибриногене только единичные связи недалеко от N-конца полипептидных цепей. Однако тромбин способен расщеплять и

синтетический субстрат — МЭТА, а также некоторые пептидные связи, образованные лизином. Это показывает, что специфичность тромбина не столь узка.

Любопытной особенностью тромбина является то, что его действие на фибриноген резко тормозится при повышении ионной силы раствора. Это можно объяснить ослаблением электростатических связей, образуемых анионными группами фибрин-пептидных участков и изменением их конфигураций в результате неионных взаимодействий. Такое изменение выводит фибрин-пептидные участки из «распластанного» состояния и делает их менее доступными для тромбина. Отсюда замедление ферментативного действия. Шерага и сотрудники [23] нашли, что 1 М раствор NaBr резко (в 1000 раз) тормозит действие тромбина на фибриноген за счет уменьшения сродства фермента к субстрату. Названные авторы объясняют этот эффект разрывом водородных связей в белке. Однако подобное предположение малообоснованно. По данным Гаррингтона и Шеллмана, высокие концентрации NaBr не разрушают, а, наоборот, делают более прочными водородные связи в растворимых белках (случай с кератином, где действительно происходит разрыв Н-связей, имеет специальное объяснение) [29]. По всей вероятности, в торможении тромбина 1 М бромистым натрием существенное значение имеет высокая ионная сила; возможен и более специфический спирализующий эффект, «защищающий» фибрин-пептидные участки молекул фибриногена от тромбина.

Создается впечатление, что тромбин в своем гидролитическом действии больше, чем другие протеиназы, зависит от стерических препятствий в макроструктуре белков и наличия Н-связей между пептидными группами. Обладая специфичностью, близкой к таковой трипсина, тромбин действует только на вполне доступные «специально выставленные» полипептидные участки белка. Быть может, в этом заключается основная причина удивительной специфичности или, вернее, ограниченности гидролизующего действия тромбина. Такая ограниченность находится в соответствии с биологической функцией данного фермента, назначение которого состоит в том, чтобы отщепить строго определенные пептиды и превратить фибриноген в фибрин-мономер, сохраняющий прочную нативную структуру, необходимую для образования конечного продукта — фибрина (денатурация мочевиной или теплом лишает фибриноген и фибрин-мономер способности переходить в фибрин).

Растворы фибриногена способны превращаться в гели, очень сходные с фибрином, под влиянием таких веществ, как формальдегид и гидрохинон [30]. По некоторым признакам такая искусственная желатинизация сходна с ферментативным свертыванием фибриногена. Для обоих превращений имеются одни и те же границы рН. Это говорит о частичной общности механизмов, действующих при полимеризации белка. Специфическое взаимодействие молекул фибрин-мономера, являющееся частью общего взаимодействия при полимеризации, заменяется реакцией с формальдегидом или хиноном. Способность формальдегида и хинона к образованию межмолекулярных мостиков в сочетании со свойственной фибриногену общей тенденцией к агрегации приводит к быстрой желатинизации.

По данным Е. Л. Ходоровой [31], для фибрин-мономера, находящегося в условиях, не допускающих полимеризации, роль полимеризующего фактора может играть внесение фенолов. Гель образует фибрин-мономер, но не фибриноген и, разумеется, не другие белки. Резорцин, пирокатехин и фенол дают одинаковый эффект, поэтому механизм не может сводиться к скреплению частиц фибрин-мономера при помощи Н-связей, образуемых фенольными гидроксильными группами (для монофенола это невозможно). Вероятно, образуются два вида межмолекулярных связей — водородные и гидрофобные.

Специфические реактивные центры молекул фибрин-мономера, образующие соединения при помощи точно сформированной системы Н-связей, по-видимому, не являются единственными структурными участками, осуществляющими полимеризацию. Определенную роль играют и другие межмолекулярные взаимодействия, свойственные как фибрин-мономеру, так и фибриногену.

Легкую осаждаемость фибриногена надо отнести за счет сродства молекул фибриногена друг к другу, а не за счет недостаточной гидрофильности. Фибриноген богат ионными и другими полярными группами, способными обеспечить высокую гидрофильность. Внутримолекулярное размещение групп здесь, по-видимому, таково, что имеется склонность к агрегации, а следовательно, и повышенная осаждаемость солями, спиртом.

В последние годы казалось общепринятым, что действие тромбина ограничивается превращением фибриногена в фибрин-мономер; полимеризация же (образование фибрина) протекает без участия фермента. Однако недавно появилась работа Ландабуру и Сигерса [32], в которой вновь поднимаются вопросы о процессах полимеризационной фазы. Авторы приводят доводы в пользу каталитического участия тромбина в реакции полимеризации фибрин-мономера. Эти доводы сводятся к следующему: 1) препараты фибрин-мономера, выдержанные в 3 М мочеvine, при разбавлении водными растворами тромбина свертываются быстрее и с более полным переходом белка в сгусток, чем при разбавлении водой; 2) МЭТА, задерживающий действие тромбина на фибриноген, тормозит и полимеризацию фибрин-мономера.

При оценке степени убедительности результатов, полученных Ландабуру и Сигерсом, надо прежде всего учесть, что препараты фибрин-мономера существенно различаются между собой по скорости полимеризации в присутствии солей и по другим свойствам. Следует полагать, что многие препараты фибрин-мономера сложны, неоднородны и состоят из частиц с неодинаковым количеством специфических реактивных центров, непосредственно участвующих в полимеризации. Наряду с частицами фибрин-мономера, обладающими полным набором реактивных центров, имеются промежуточные формы, лишь частично измененные тромбином. Легко себе представить, что в результате воздействия мочевины эти формы в первую очередь теряют способность участвовать в полимеризации; отсюда замедление и неполнота свертывания при разбавлении водой. При разбавлении раствором тромбина благодаря действию последнего на промежуточные формы повышается как скорость, так и полнота свертывания.

Что касается действия МЭТА, то для этого двухвалентного органического катиона можно ожидать значительного неспецифического эффекта на фибрин-мономер. Не доказано, что в опытах Ландабуру и Сигерса МЭТА действовал как ингибитор тромбина, а не как ингибитор фибрин-мономера. Вполне убедительных доводов в пользу существования полимеризующей функции тромбина не имеется.

С другой стороны, представление о катализе полимеризации тромбином находится в прямом противоречии с данными, полученными в свое время в нашей лаборатории [33]. Согласно этим данным, гепарин купирует превращение фибриногена в фибрин-мономер, но совершенно не влияет на полимеризацию уже образовавшегося фибрин-мономера. В наших опытах превращение фибриногена проводилось тромбином в присутствии 200 мг/мл мочевины; за ходом образования фибрин-мономера удавалось проследить по укорочению времени свертывания в пробе, отобранной из инкубируемой смеси и сильно разбавленной 0,9% NaCl. Отбирая на разных стадиях процесса превращения фибриногена по две пробы и производя разбавление после внесения гепарина в одну из проб, мы констатировали, что обе пробы

свертывают
низирован
вания. Ес
фермента,
рости обра
Можно
мог бы дей
на образо
стиков и
кую энерг
Механ
щей поли
считаться
гичный ус
ний, прои

1. McF a
2. Born
3. Arsc
4. Milst
5. Milst
6. Milst
7. Seeg
8. Mille
9. Seeg
10. Surg
- Phys
11. Golc
- E. J
12. Бел
- мичн
13. Ход
- 1956
14. Seeg
- 36,
15. Gla
16. Bar
- ний
17. Mor
18. Lak
19. Blo
20. Хо
21. Ва
22. Blc
23. She
24. На
25. Мо
26. На
27. Хо
28. Ми
29. На
30. Ми
31. Хо
32. La
33. Бе

свертываются с одинаковой скоростью. Дополнительная инкубация гепаринизированной пробы до момента разбавления не удлиняет времени свертывания. Если бы тромбин функционировал в качестве полимеризующего фермента, то его выключение гепарином не было бы безразличным для скорости образования фибрина в растворах фибрин-мономера.

Можно добавить, что и теоретически трудно понять, каким образом мог бы действовать фермент, вызывающий полимеризацию, основанную не на образовании химических связей, а на возникновении водородных мостиков и других межмолекулярных взаимодействий, имеющих очень низкую энергию активации.

Механизмы превращения фибриногена в фибрин-мономер и последующей полимеризации еще требуют уточнения, но в своей основе они могут считаться выясненными. Надо надеяться, что в недалеком будущем аналогичный успех будет достигнут и в отношении некоторых других превращений, происходящих при свертывании крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. McFarlane R. The Plasma Proteins, 1960, 2, 137.
2. Born G. Bioch. J., 1958, 68, 695.
3. Arscott P., Koppel G., Quinn J. Nature, 1959, 183, 753.
4. Milstone J. J. Gen. Physiol., 1959, 42, 665.
5. Milstone J. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1960, 103, 361.
6. Milstone J. Nature, 1960, 187, 1127.
7. Seegers W., Loomis J., Vandenbelt E. Arch. Bioch., 1945, 6, 85.
8. Miller K. J. Biol. Chem., 1958, 231, 987.
9. Seegers W., Landaburu R. Canad. J. Bioch. Physiol., 1960, 38, 1405.
10. Surgenor D., Alexander B., Goldstein R., Schmidt K. J. Phys. Coll. Chem., 1951, 55, 94.
11. Goldstein R., Le Bolloch A., Alexander B., Zonderman E. J. Biol. Chem., 1959, 234, 2857.
12. Белицер В. О., Ходорова Е. Л., Лосева А. Л. Український біохімічний журнал, 1961, 33, в печати.
13. Ходорова Е. Л., Белик Я. В. Український біохімічний журнал, 1956, 28, 142.
14. Seegers W., Levine W., Shepard R. Canad. J. Bioch. Physiol., 1958, 36, 603.
15. Gladner J., Laki K., Stolman F. Bioch. Biophys. Acta., 1958, 27, 218.
16. Варецкая Т. В., Лосева А. Л., Яценко В. И. Український біохімічний журнал, 1961, 33.
17. Morrison P. Proc. Soc. Exptl. Biol. M., 1951, 78, 653.
18. Laki K. Arch. Bioch. Biophys., 1951, 32, 317.
19. Blombäck M., Blombäck B. Arkiv for Kemi, 1957, 10, 417.
20. Ходорова Е. Л. Український біохімічний журнал, 1950, 22, 176.
21. Варецкая Т. В. Український біохімічний журнал, 1960, 32, 13.
22. Blombäck B. Arkiv for Kemi, 1958, 12, 99.
23. Shegaga H., Laskowski M. Adv. Prot. Chem., 1957, 12, 1.
24. Hall C., Slater H. J. Biophys. Bioch. Cytol., 1959, 5, No 1, 11.
25. Morrison P. Amer. J. Med. Sci., 1946, 211, 325.
26. Hartley R., Waugh D. J. Amer. Chem. Soc., 1960, 82, 978.
27. Ходорова Е. Л. Український біохімічний журнал, 1951, 23, 439.
28. Mihalyi E. Abs. of Papers 135 Meeting Amer. Chem. Soc., 1959.
29. Haly A., Spaitth J. Bioch. Biophys. Acta, 1960, 44, 180.
30. Mihalyi E., Logan L. Hung Act. Physiol., 1948, 1, 218.
31. Ходорова Е. Л. Український біохімічний журнал, 1960, 32, 530.
32. Landaburn R., Seegers W. Am. J. Physiol., 1960, 198, 173.
33. Белицер В. Л., Белик Я. В. Доклады АН СССР, 1953, 51, 895.

ГЛАВА VII

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОБМЕН УГЛЕВОДОВ И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

С. Е. Северин

1. ГЛИКОЛИЗ*

Проблема обмена энергии в животном организме является весьма сложной. Известно, что из большого числа реакций, сопровождающихся уменьшением запаса свободной энергии, лишь немногие приводят к образованию и накоплению богатых энергией фосфорных соединений, хотя именно в виде этих соединений в организме накапливаются запасы энергии в готовой к использованию форме. В богатых энергией фосфорных соединениях остаток фосфорной кислоты может находиться в виде пирогосфатной группировки $P-O-P-$, в виде карбоксил-фосфата $-C-O-P-$, энолфос-

фатной группировки $-C(=O)-O-P-$ или в виде аминокислотной группировки $-N(=O)-P-$ или иминсфосфорной кислоты $-N(=O)-P(=O)(OH)-$. Наиболее универсальным и наиболее распространенным из богатых энергией фосфорных соединений является аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). Образованием ее завершаются процессы обмена веществ, при которых осуществляется накопление энергии в легко утилизируемой форме. Такими процессами являются биологическое окисление, сопряженное с фосфорилированием (окислительное или дыхательное фосфорилирование) и совокупность реакций анаэробного распада углеводов, или гликолиз. Последний процесс — гликолиз — изучен детальнее, чем биологическое окисление, и с него целесообразно начать рассмотрение процессов, приводящих к образованию богатых энергией фосфатных группировок в аденозинтрифосфорной кислоте.

Гликолиз представляет собой совокупность анаэробных ферментативных процессов распада глюкозы, завершающихся образованием молочной кислоты. В том случае, если исходным субстратом гликолиза является не глюкоза, а гликоген, процесс называют гликогенолизом. Как гликолиз, так и гликогенолиз протекают без использования кислорода, однако это не значит, что расщепление глюкозы или гликогена по пути гликолиза или гликогенолиза не может происходить в присутствии кислорода. В этом случае

* Принятые сокращения см. стр. 209.

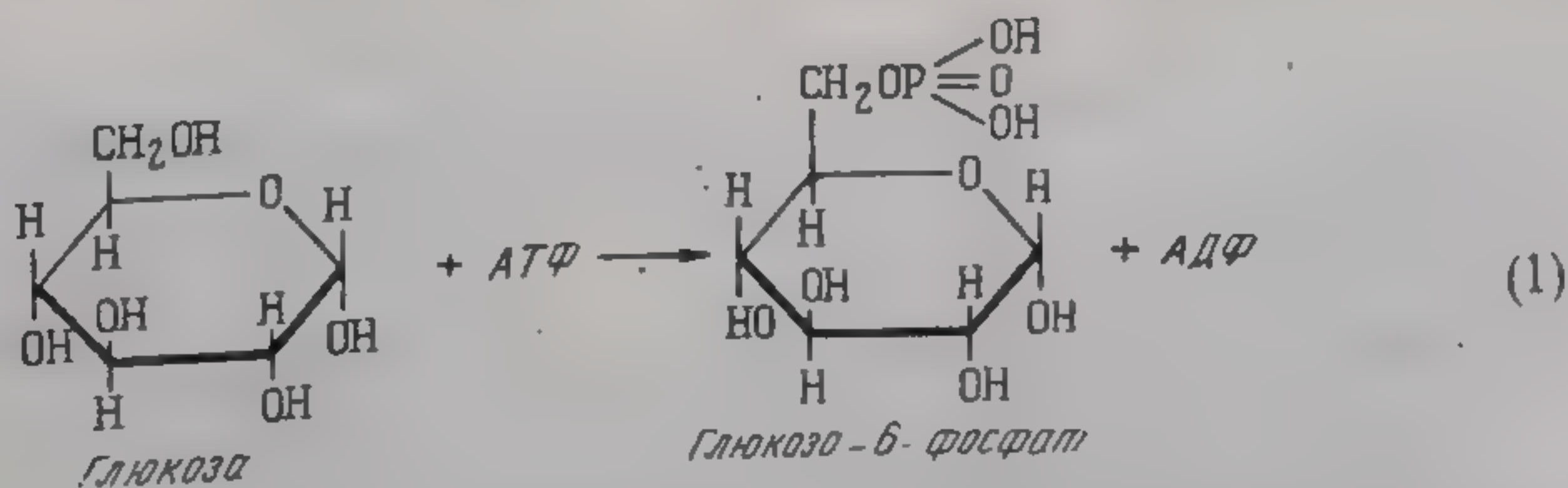
говорят об аэробном гликолизе, желая подчеркнуть, что анаэробный процесс распада углеводов осуществляется, несмотря на присутствие кислорода, который не вовлекается в данном случае в реакции превращения углеводов. Для некоторых клеток и тканей характерен аэробный гликолиз: например, для эритроцитов млекопитающих, эмбриональной ткани, клеток злокачественной опухоли, сетчатки глаза. В других клетках и тканях образование молочной кислоты в результате распада углеводов можно наблюдать только в анаэробных условиях или при искусственном прекращении потребления кислорода добавлением ядов, угнетающих клеточное дыхание (например, цианидов или азидов). К числу таких клеток относятся эритроциты птиц, ткань почек, поджелудочной железы. Во многих тканях образование молочной кислоты можно наблюдать за счет процесса гликолиза в анаэробных, а также в аэробных условиях, однако в последнем случае количество накапливающейся в опытной пробе молочной кислоты значительно меньше.

При описании процесса гликолиза необходимо осветить 1) последовательность отдельных, следующих друг за другом реакций, приводящих к образованию молочной кислоты, 2) энергетический их эффект, 3) сущность задерживающего влияния аэробноза (атмосферы кислорода) на гликолиз и, наконец, дальнейшую судьбу образовавшейся при гликолизе молочной кислоты.

Процесс гликолиза вначале наблюдали в крови, выпущенной из кровеносной системы. При хранении крови в ней отмечено уменьшение содержания сахара. Считали, что этот процесс вызван ферментами крови, так как он не мог быть приписан действию микроорганизмов. В дальнейшем параллельно исследовали процесс сбраживания углеводов в присутствии дрожжевых клеток и процесс расщепления углеводов в мышечной ткани; оба процесса имели много сходства, хотя каждый из них обладал и рядом особенностей. Излюбленным объектом для изучения анаэробного распада углеводов в животном организме служила и продолжает служить мышечная ткань в виде срезов, кашки, гомогенатов, экстрактов и, наконец, выделенных из нее и очищенных индивидуальных ферментов.

В результате многочисленных опытов, проведенных на мышечной ткани, сопоставления полученных результатов с данными исследований процессов брожения, подробного изучения реакций, вызываемых отдельными индивидуальными ферментами, сложный процесс гликолиза был более или менее выяснен. Он состоит из ряда последовательных реакций.

А. Процесс анаэробного расщепления глюкозы начинается с ее фосфорилирования и образования глюкозо-6-фосфата. Эта реакция осуществляется ферментом гексокиназой или глюкокиназой. Общим наименованием — киназы¹ — современная биохимия обозначает ферменты, перенося-

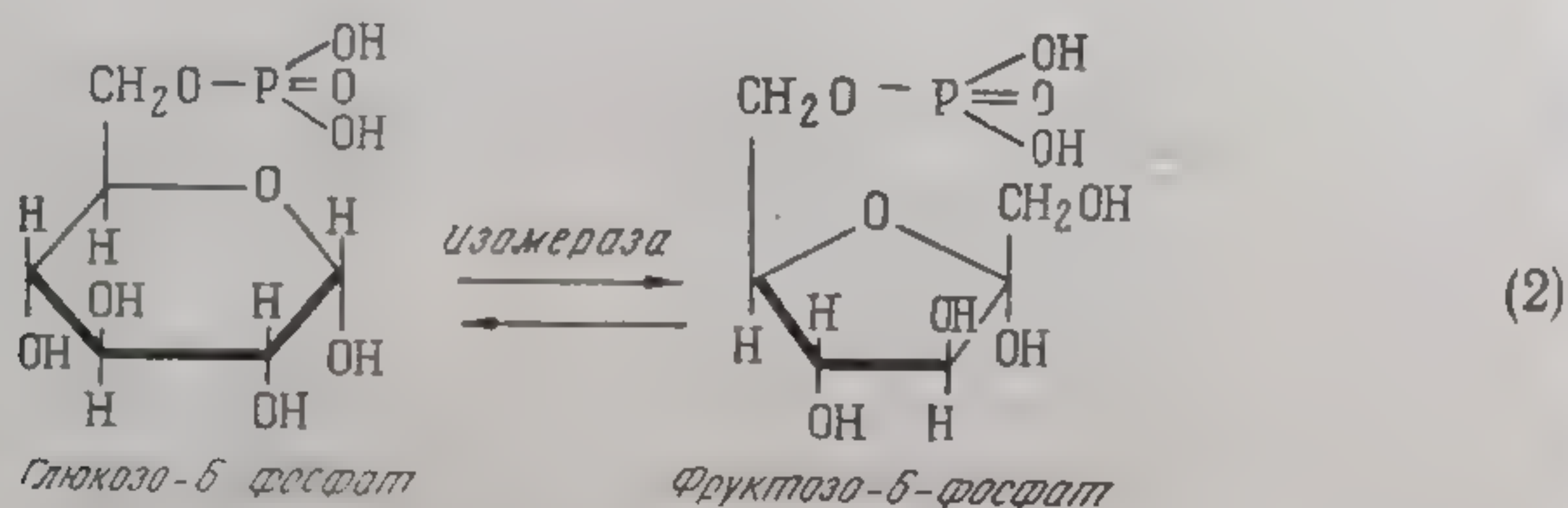


¹ Исключение составляют некоторые ферменты, не связанные с переносом фосфатного остатка, но давно уже получившие свое название, сохранившееся и до сих пор. Например, тромбокиназа (фермент, активирующий протромбин), энтерокиназа (фермент, активирующий трипсиноген) и др.

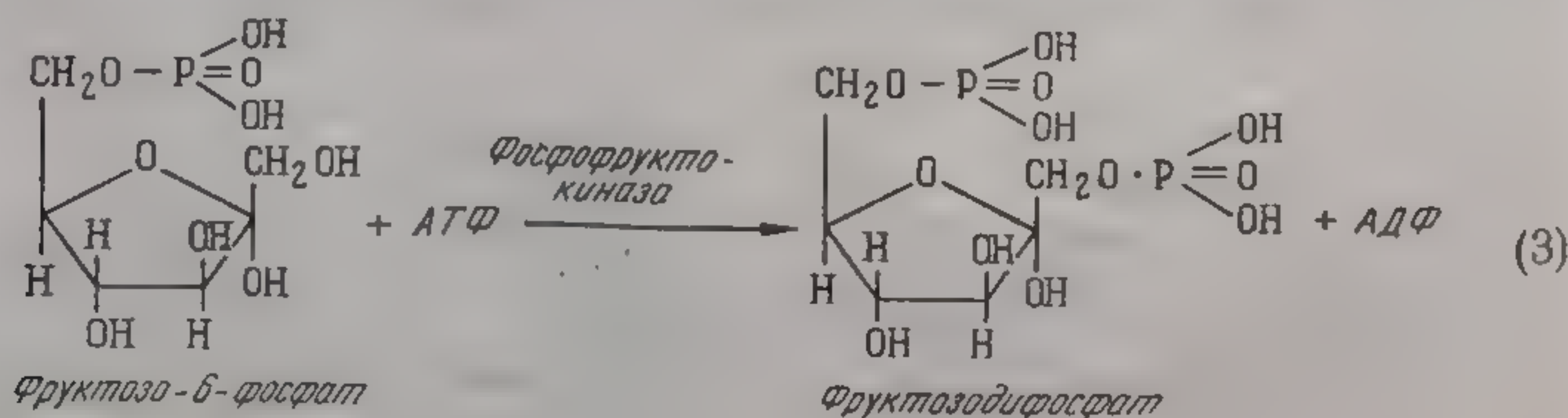
щие остаток фосфорной кислоты с АТФ на какое-либо другое вещество. Как показывает само название, глюкокиназа является ферментом, катализирующим реакцию образования фосфорилированной глюкозы.

Остаток фосфорной кислоты образует эфирную связь с первичным спиртовым гидроксилем, стоящим при шестом углеродном атоме глюкозы. В скелетной мускулатуре этот фермент в нормальных условиях мало активен; он значительно активнее в мышце сердца. При различных патологических условиях, например при денервации, активность гексокиназы в мышцах резко повышается (В. С. Ильин с сотрудниками). Запас энергии фосфорной связи в глюкозо-6-фосфате значительно ниже, чем в фосфатной связи конечного остатка фосфорной кислоты в АТФ. Благодаря этому образование глюкозо-6-фосфата при глюкокиназной реакции практически необратимо. Оптимум активности лежит при рН около 8,0.

Б. Образовавшийся глюкозо-6-фосфат подвергается изомеризации — превращению во фруктозо-6-фосфат, причем между обоими фосфорными эфирами в мышечной ткани устанавливается равновесие при содержании приблизительно 70% глюкозо-6-фосфата и 30% фруктозо-6-фосфата. Смесь этих фосфорных эфиров в мышечной ткани получила название эфира Эмбдена. Превращение глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат связано лишь с весьма незначительным изменением свободной энергии, исчисляющимся десятками долями килокалории на моль.



В. Несмотря на то что равновесие между фосфорными эфирами глюкозы и фруктозы смещено в сторону глюкозо-6-фосфата, дальнейшим превращениям, а именно процессу фосфорилирования, подвергается фруктозо-6-фосфат. Это еще одна киназная реакция, катализируемая ферментом фосфофруктокиназой и приводящая к образованию фруктозо-1-6-дифосфата — эфира Иванова или Гардена и Ионга:

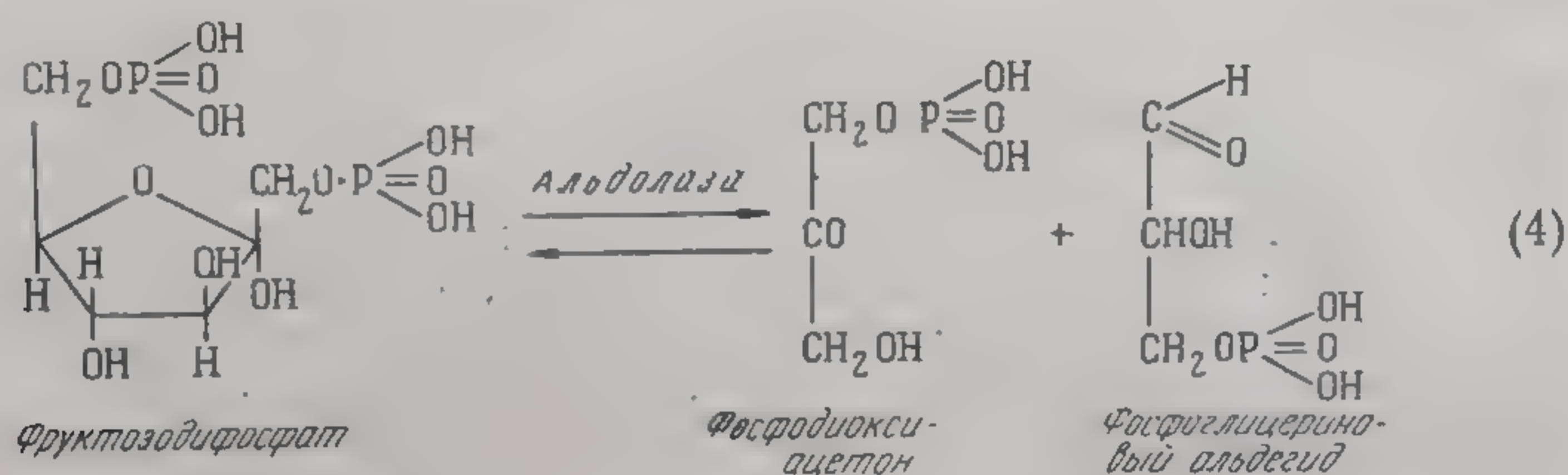


Так как запас энергии в фосфатной связи АТФ значительно выше, чем во фруктозо-1-6-дифосфате, то и эта фосфофруктокиназная реакция, аналогично глюкокиназной реакции, практически необратима. Фермент фосфофруктокиназа мышечной ткани подробно изучен С. А. Нейфахом. Молеку-

лярный вес фермента оказался равным 120 000, оптимум действия pH 7,2—7,3. По пути реакций от свободной глюкозы до образования фруктозо-1-6-дифосфата были использованы дважды конечные остатки фосфорной кислоты молекулы АТФ. Таким образом, до образования фруктозодифосфата запасы свободной энергии, имевшиеся в системе в виде фосфорных остатков, уменьшились на две богатые энергией фосфатные связи (2~P).

Все рассмотренные процессы не могут считаться в какой-либо мере специфическими для анаэробных превращений углеводов. Эти же реакции активно протекают и в атмосфере кислорода. Фруктозодифосфат может в значительных количествах накапливаться в измельченной мышечной ткани при ее инкубации в атмосфере кислорода, если почему-либо дальнейшее превращение этого эфира затруднено. Хотя, как уже сказано, атмосфера кислорода не препятствует образованию фруктозодифосфата, все же этот субстрат может считаться характерным для гликолиза, так как окислительным превращениям он не подвергается.

Г. На стадии фруктозо-1-6 дифосфата проявляет свою активность фермент альдолаза, очень широко распространенный в животных тканях. Действие альдолазы заключается в катализе обратимой реакции, приводящей к равновесному состоянию между фруктозодифосфатом и фосфотриозами.



Строго специфическим компонентом при реакции конденсации является фосфодиоксиацетон; глицеральдегид может быть замещен другими альдегидами.

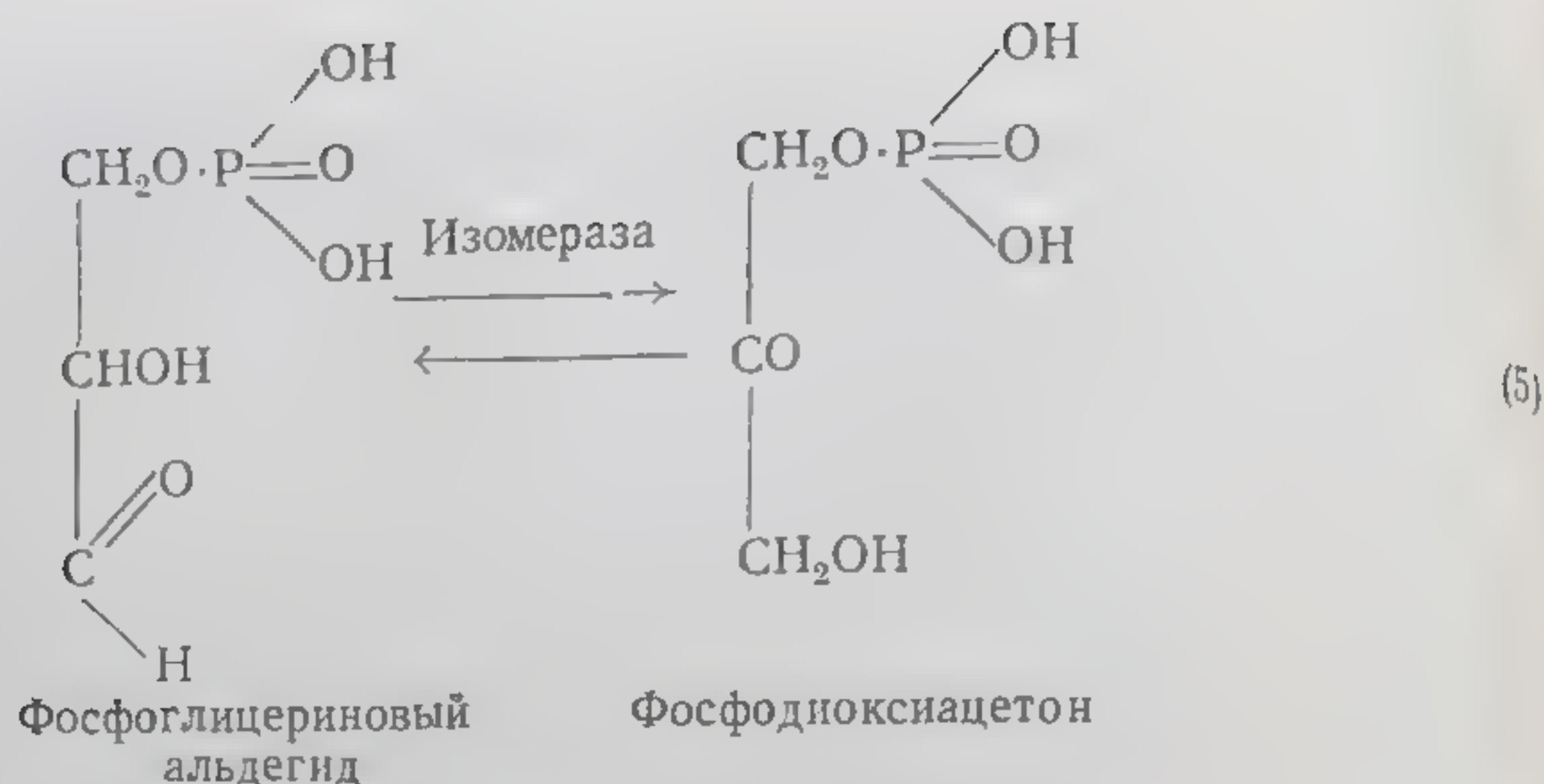
Между исходным продуктом и образовавшимися при альдолазной реакции веществами устанавливается равновесие: соотношение концентраций фруктозодифосфата и каждой из фосфотриоз находится в зависимости от температуры инкубации. При 20° константа равновесия (K) равна:

$$K = \frac{C_1^2}{C_2} = 0,125 \cdot 10^{-3}$$

(C₁—молярная концентрация каждой из фосфотриоз, C₂—молярная концентрация фруктозодифосфата). При 60° K равновесия равна 0,99 · 10⁻³; т. е. при этой температуре концентрации всех компонентов реакции являются близкими друг другу.

Альдолаза из мышечной ткани входит в миогеновую фракцию белков, легко может быть получена в кристаллическом виде, обладает оптимумом активности при pH около 7,0 или 9,0 в зависимости от состава буферного раствора и способа улавливания фосфотриоз. Молекулярный вес альдолазы из мышц близок к 147 000.

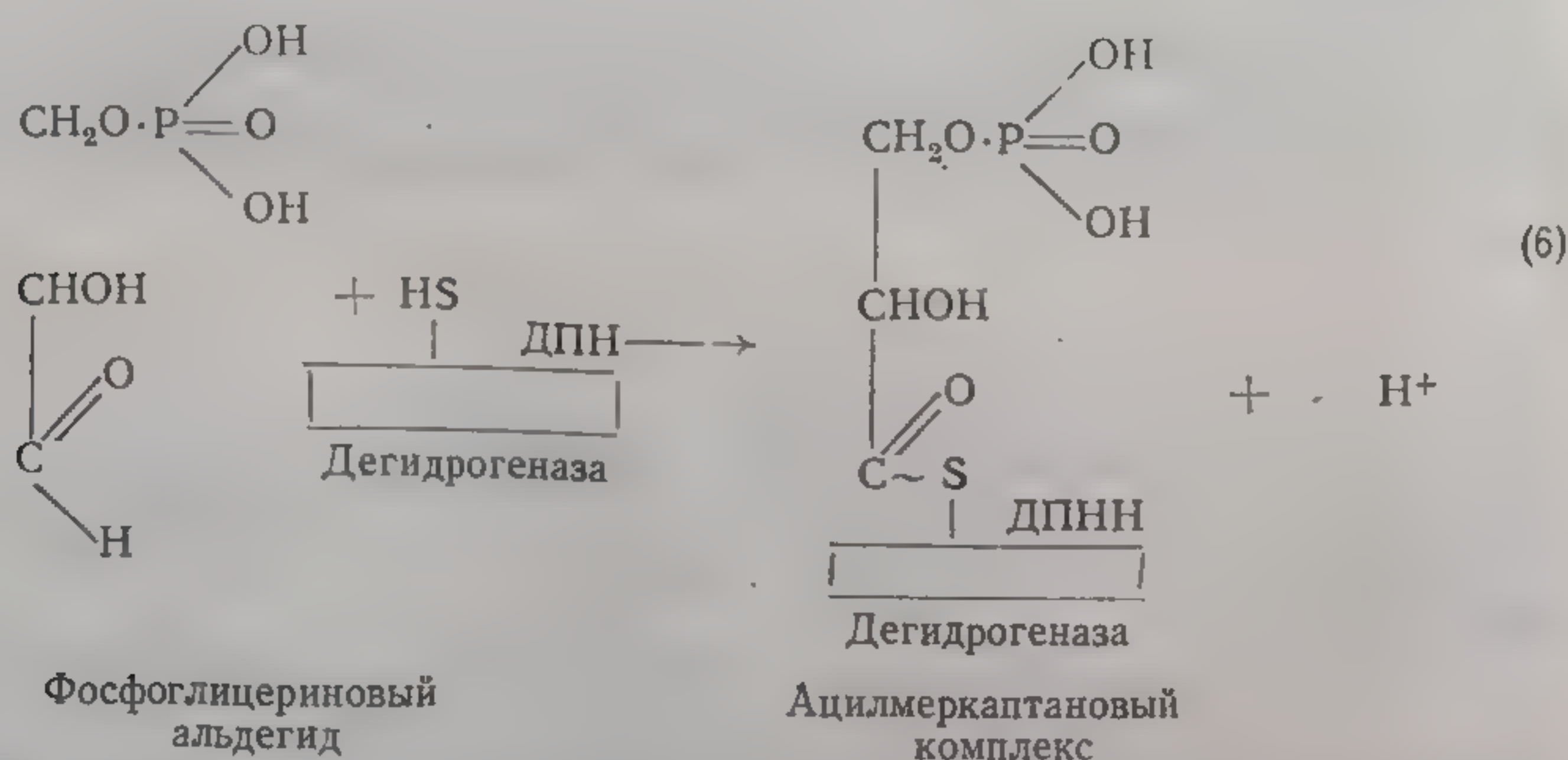
Д. Следующей является реакция изомеризации, протекающая между фосфотриозами:



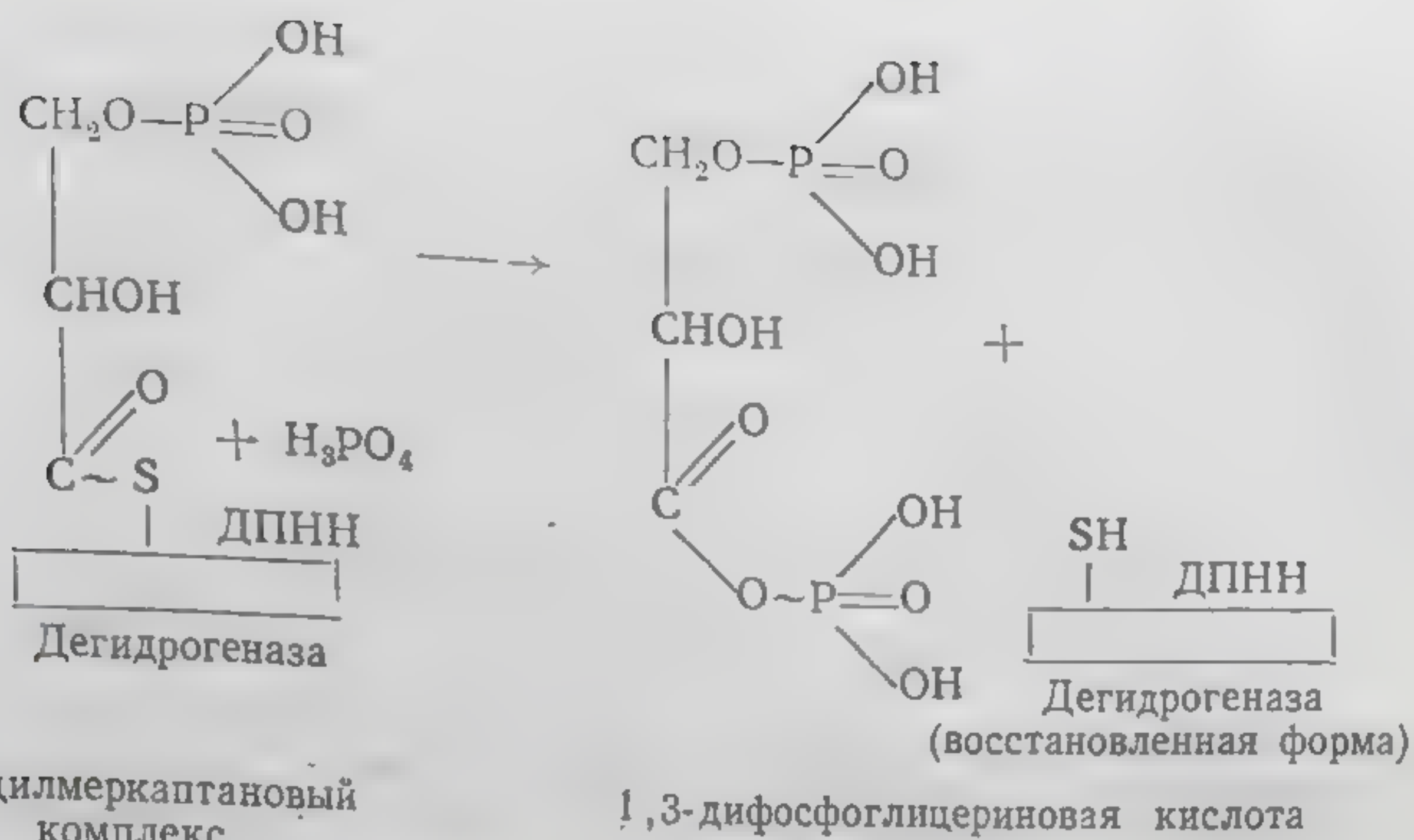
Равновесие между фосфотриозами устанавливается при 95% содержании фосфодиоксиацетона и 5% фосфоглицеринового альдегида. Несмотря на это, дальнейшим превращениям подвергается именно фосфоглицериновый альдегид в реакции, являющейся наиболее существенной для анаэробного распада углеводов, играющей в гликолизе центральную роль и называющейся реакцией гликолитической оксиредукции.

Фермент изомераза, белок с молекулярным весом 100 000, получена в кристаллическом виде, оптимум активности при pH 7—8.

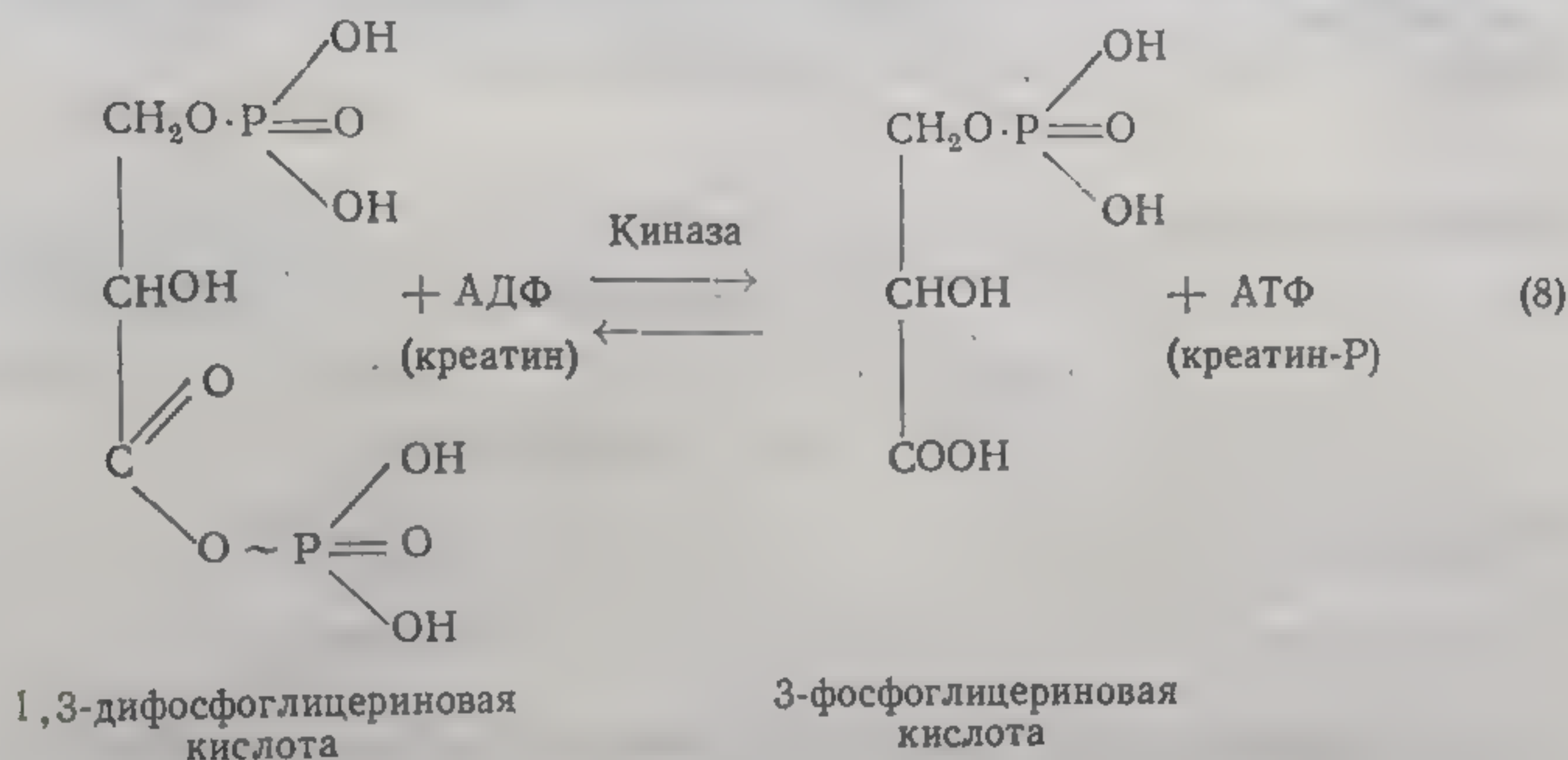
Е. Фермент, катализирующий реакцию окисления фосфоглицеринового альдегида, называется фосфоглицеринальдегид-дегидрогеназой. Это белок с молекулярным весом 120 000, кристаллизующийся в виде комплексного соединения с двумя частицами ДПН; pH оптимум лежит в щелочной среде (pH 9). Фермент полностью угнетается галоидопроизводными уксусной кислоты: монойод- и монобромацетатом, связывающим SH-группы белка. Структура фермента сложная и механизм действия складывается из нескольких последовательных этапов. Первый из них может рассматриваться как непосредственное взаимодействие и соединение фосфоглицеринового альдегида с дегидрогеназой за счет SH-группы трипептида глутатиона, находящегося в составе полипептидной цепи белка фермента. Освобождающийся при этом водород акцептируется дифосфопиридиннуклеотидом, входящим в комплексное, способное к диссоциации соединение с белком. Реакция протекает по следующему уравнению:



Ж. В образовавшемся ацилмеркаптановом соединении дифосфопиридиннуклеотид находится уже не в окисленной, а в восстановленной форме, а связь —C~S—является непрочной, богатой энергией, спонтанно расщепляющейся в присутствии фосфорной кислоты с образованием ацилфосфата.

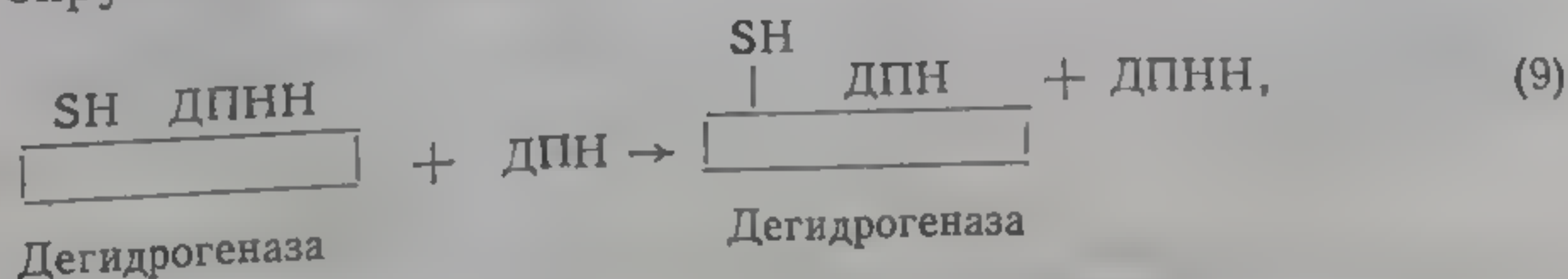


3. Процесс гликолиза может протекать дальше с достаточной скоростью лишь при осуществлении киназной реакции, приводящей к передаче богатого энергией фосфатного остатка на адениловую систему (на АДФ) или, если речь идет о скелетных мышцах, то и непосредственно на креатин.



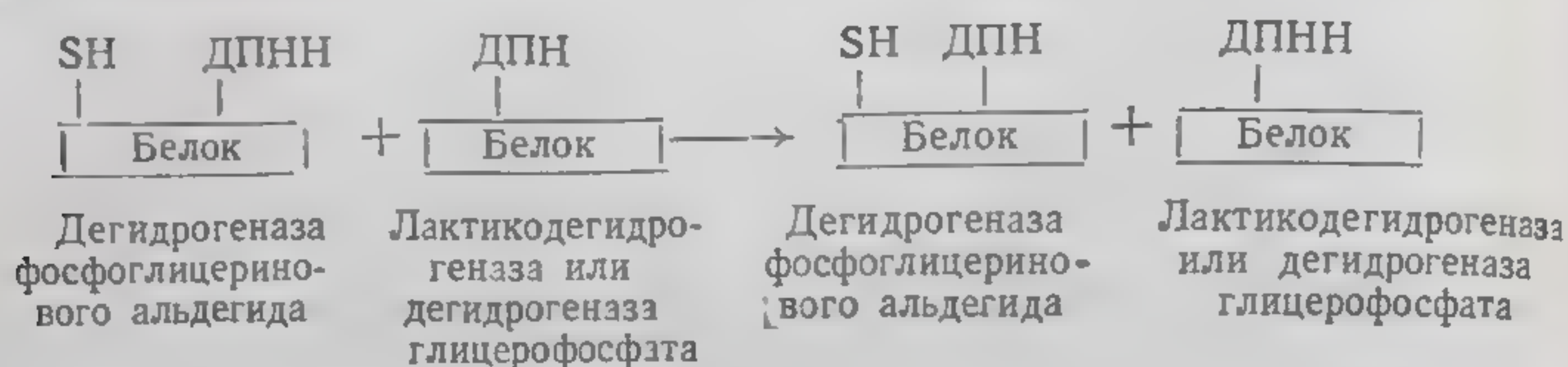
Эта киназная реакция весьма существенна, так как именно благодаря ей энергия, освобождающаяся при окислении фосфоглицеринового альдегида, аккумулируется в виде универсального высокоэнергетического соединения — АТФ.

И. Перенос фосфатного остатка с 1,3-дифосфоглицериновой кислоты на адениловую систему является не единственным условием активного течения реакции гликолитической оксидоредукции. Не меньшую роль играет превращение восстановленного дифосфопиридиннуклеотида в окисленную форму, способную вновь (в составе дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида) участвовать в реакции гликолитической оксидоредукции. Однако сначала ДПНН, находящийся в составе дегидрогеназы, должен обменяться на ДПН из окружающей среды:

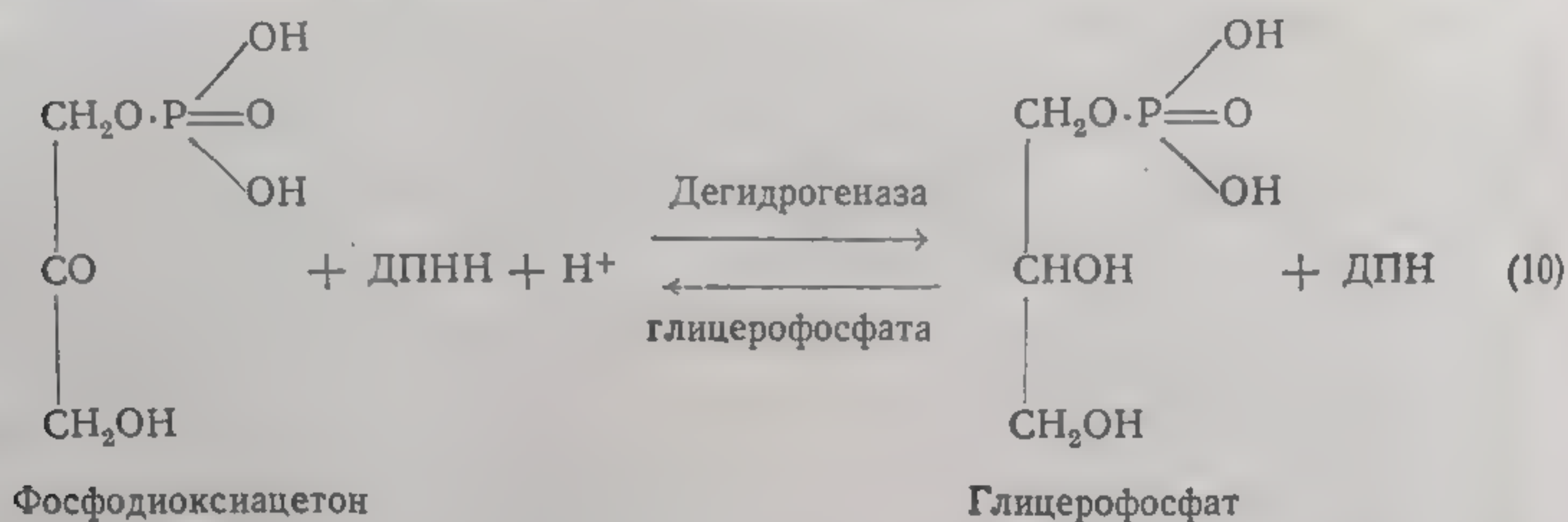


а затем ДПНН в составе других дегидрогеназ передает свой водород на акцептирующие его вещества.

Возможен и другой тип реакции. Дегидрогеназа фосфоглицеринового альдегида после перехода в восстановленную форму передает свой водород на ДПН, находящийся в составе дегидрогеназы глицерофосфата или лактикодегидрогеназы. При этом дифосфопиридиннуклеотид, присоединенный к белку дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида, переходит в окисленную форму (ДПН), а кофермент, присоединенный к белку дегидрогеназы глицерофосфата или лактикодегидрогеназы, переходит в восстановленную форму (ДПНН+H⁺).



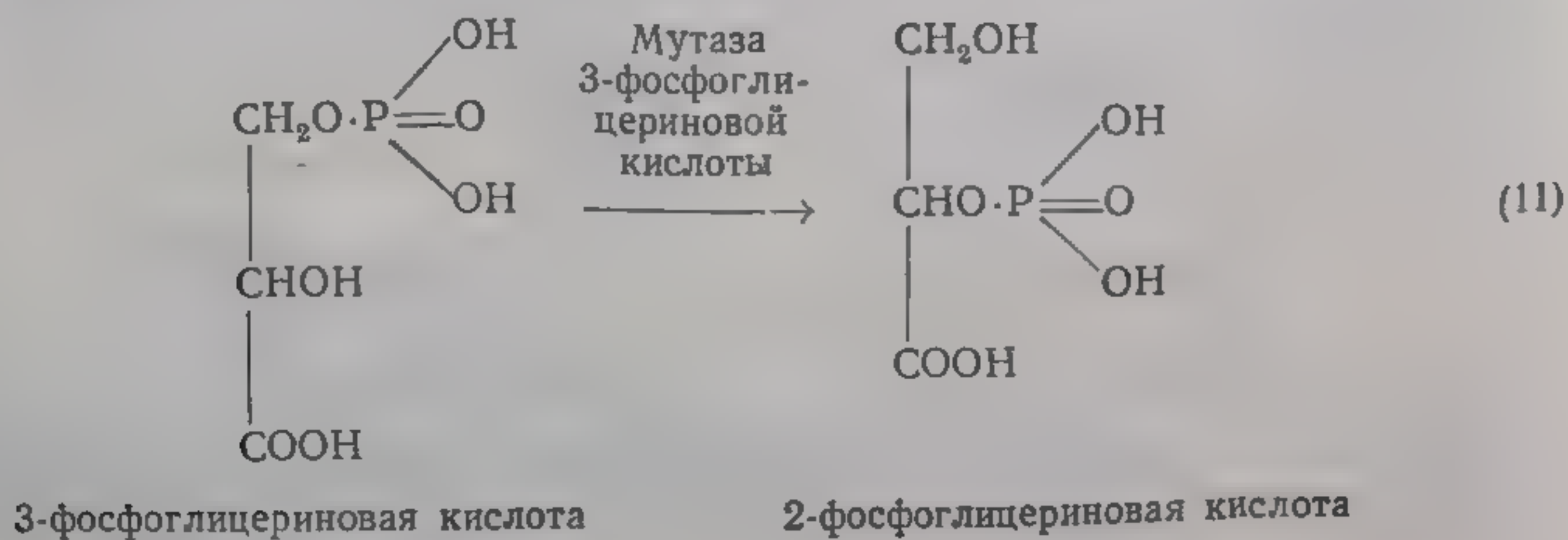
К. Акцептором водорода ДПНН в начальном периоде гликолиза является фосфодиоксиацетон. Эта реакция катализируется соответствующим ферментом — дегидрогеназой глицерофосфата, белком, полученным в кристаллическом виде и содержащим неидентифицированную простетическую группу. Реакция протекает по уравнению:



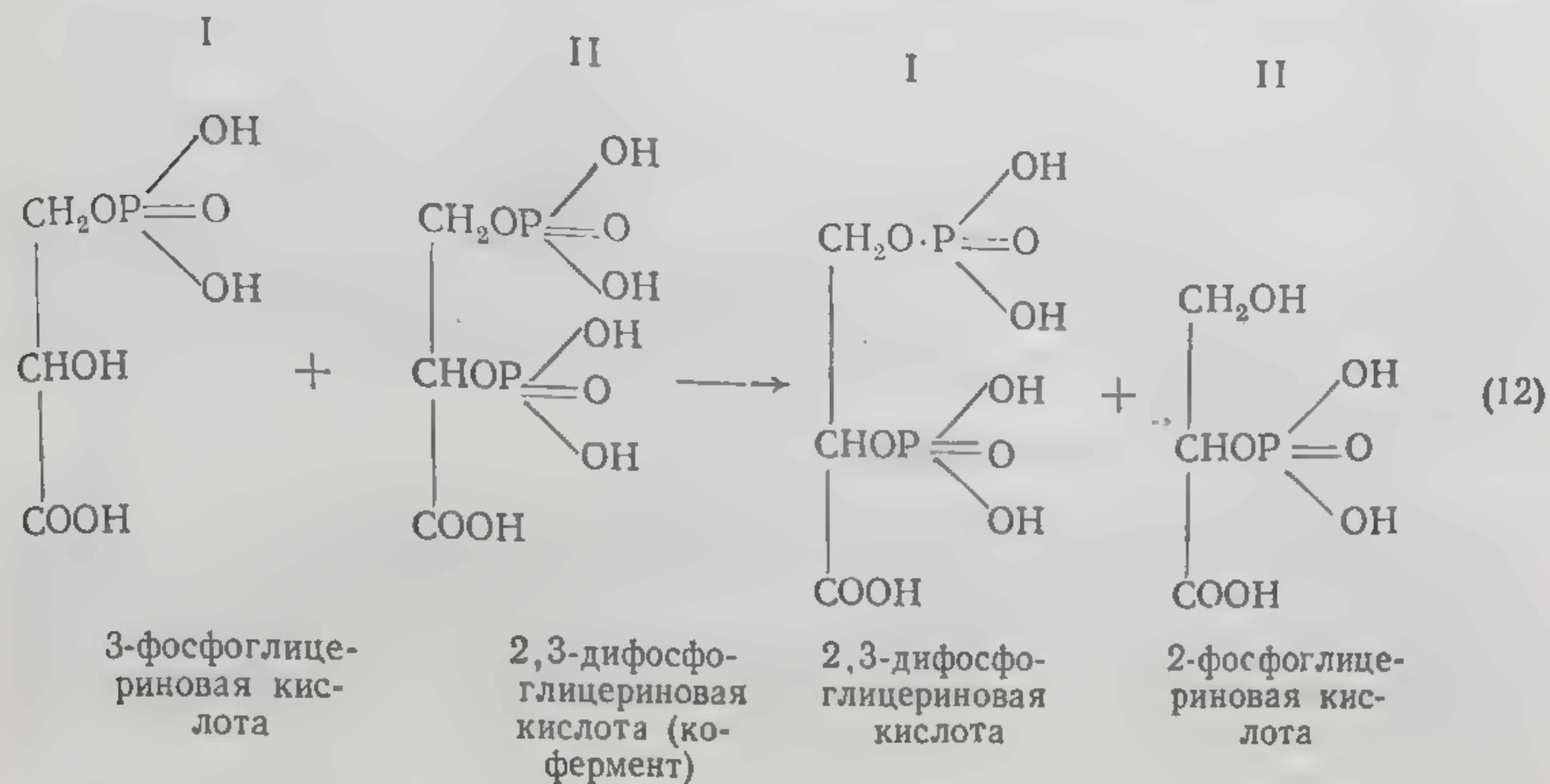
При интенсивно протекающем процессе гликолиза акцептором водорода является пировиноградная кислота, а ферментом, катализирующим этот процесс, — лактикодегидрогеназа, однако об этой реакции будет сказано несколько позднее.

Итак, в результате реакции гликолитической оксидоредукции образовалась 3-фосфоглицериновая кислота и АТФ.

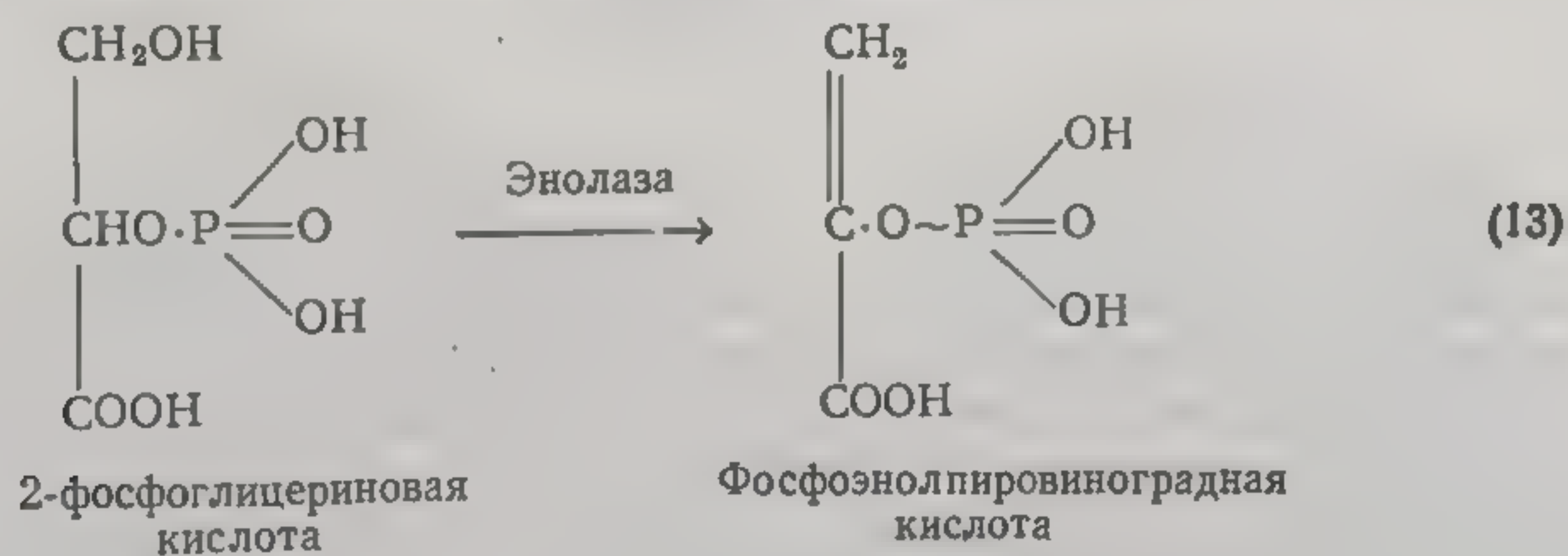
Л. Дальнейший путь превращений 3-фосфоглицериновой кислоты состоит из ряда последовательных реакций, первая из которых катализируется малоизученным ферментом глицеромутазой и заключается в образовании 2-фосфоглицериновой кислоты.



Коферментом мутазной реакции служит 2,3-дифосфоглицериновая кислота; фосфорный остаток, стоящий в ней при третьем атоме углерода, переносится на второй углеродный атом молекулы 3-фосфоглицериновой кислоты. Благодаря этому образуется 2-фосфоглицериновая кислота.



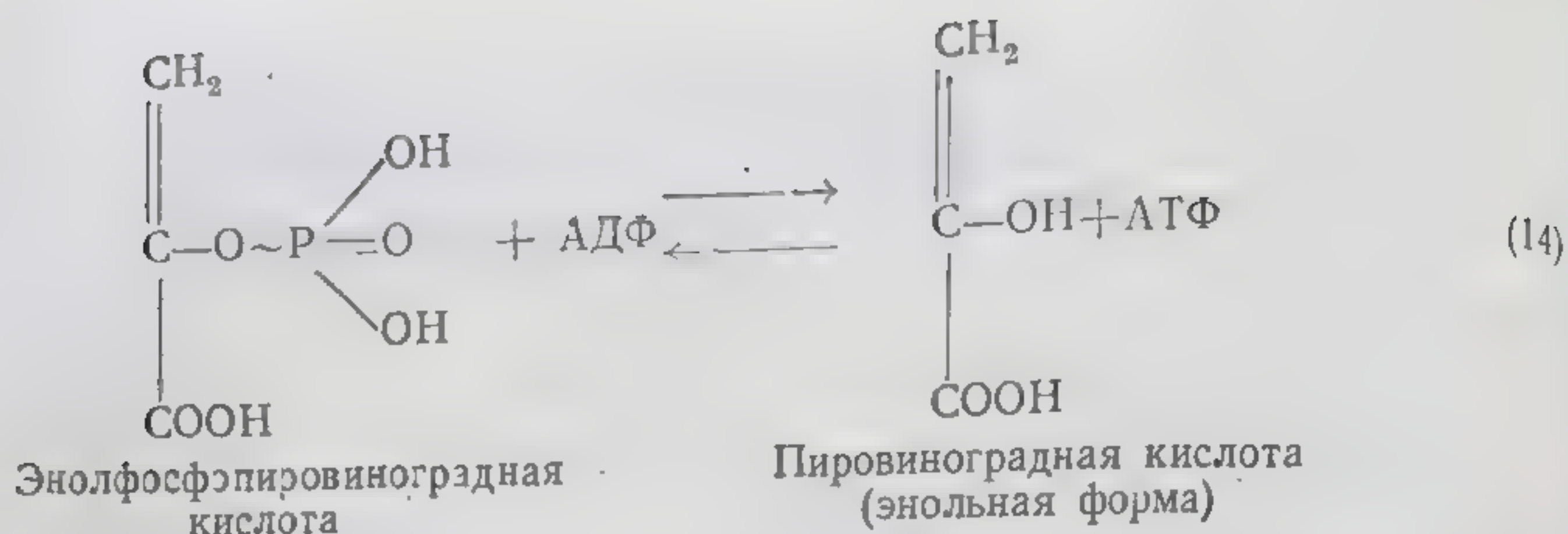
М. 2-фосфоглицериновая кислота в присутствии фермента энолазы превращается в фосфоэнолпировиноградную кислоту.



Энолаза получена из дрожжей в виде кристаллического ртутного производного; для активации независимо от источника получения требует присутствия двухвалентных ионов Mg, Mn или Zn. Характерной особенностью фермента является резкое подавление его активности в присутствии фосфатов при добавлении фтористого натрия. Это объясняется образованием флутов при добавлении фтористого натрия. Это объясняется образованием флутов при добавлении фтористого натрия. Это объясняется образованием флутов при добавлении фтористого натрия. Это объясняется образованием флутов при добавлении фтористого натрия.

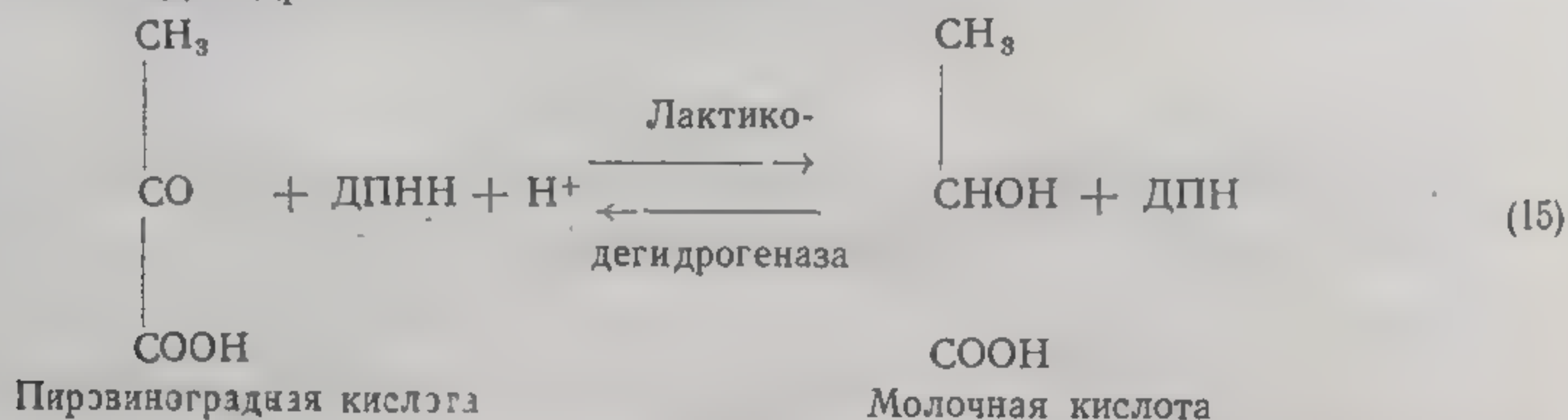
Н. Перенос фосфатного остатка на АДФ осуществляется при участии соответствующей киназы — пируват киназы — фермента с молекулярным весом 166 000, полученного в кристаллическом виде из мышечной ткани крыс.

В присутствии ионов K⁺ или NH₄⁺, Mg⁺⁺ и АТФ реакция полностью обратима, хотя скорость прямого процесса значительно больше, чем обратного. При отсутствии ионов K⁺ реакция практически не идет.



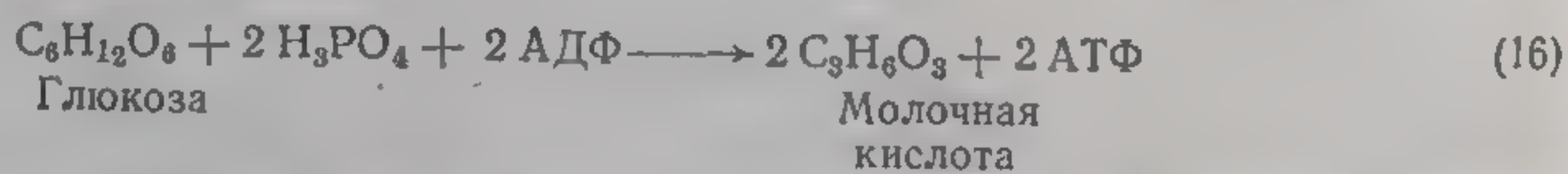
Таким образом, наравне с гликолитической оксидоредукцией энолазная активность в сочетании с соответствующими киназными реакциями обеспечивает образование и накопление богатых энергией фосфорных соединений в виде АТФ.

О. Наконец, последняя реакция в цепи анаэробных превращений углеводов в животных тканях связана с превращением пировиноградной кислоты в молочную. Эта реакция обеспечивается ферментом лактикодегидрогеназой, выделенной в кристаллическом виде из мышечной ткани. В качестве кофермента в реакции участвует дифосфопиридиннуклеотид, который может быть замещен трифосфопиридиннуклеотидом, однако с сохранением лишь 1% лактикодегидрогеназной активности:



Образование ДПН из восстановленной формы дифосфопиридиннуклеотида при участии лактикодегидрогеназы является основным путем, обеспечивающим возможность непрерывного течения реакции гликолитической оксидоредукции. Как упоминалось выше, это звено в цепи анаэробных превращений углеводов постоянно требует замены в составе дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида ДПНН на ДПН (реакция 9) и акцептирования водорода ДПНН на соответствующих субстратах (реакции 10 и 15).

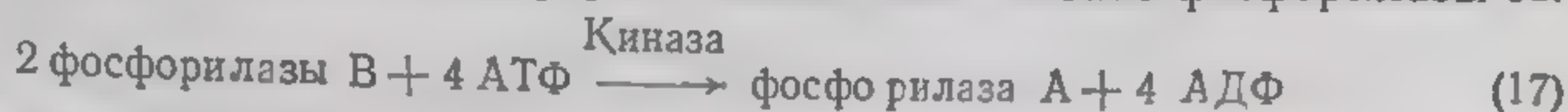
Суммируя сказанное, итог всех рассмотренных реакций можно представить в следующем виде:



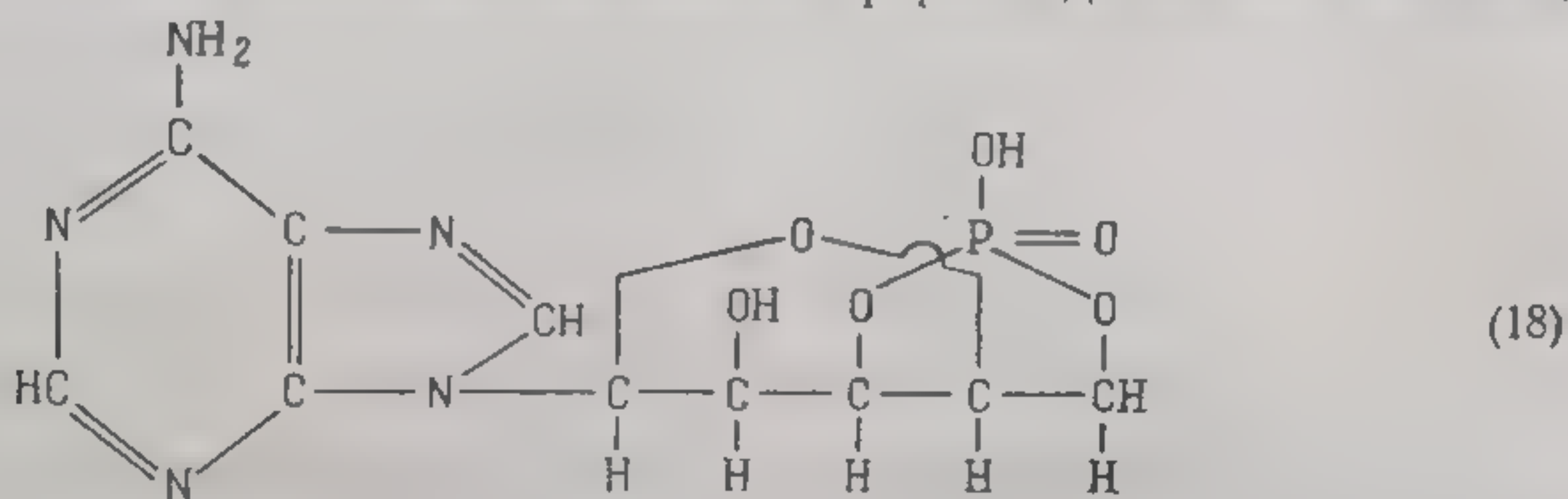
Другими словами, при образовании двух молекул молочной кислоты из глюкозы в процессе гликолиза вначале **расходуются** два богатых энергией фосфатных остатка АТФ ($-\text{O}-\text{P}-$ при гексокиназной и фосфофруктокиназной реакциях), а затем образуются четыре богатых энергией связи: две при гликолитической оксидоредукции и две при энолазной реакции (расчет на одну молекулу глюкозы или две молекулы фрагментов, содержащих по три углеродных атома).

II. В мышечной ткани, а также в печени содержатся значительные количества полисахарида гликогена. Начальным субстратом анаэробного распада углеводов в этих тканях является не глюкоза, а гликоген и процесс в целом правильнее называть не гликолизом, а гликогенолизом. Превращение гликогена начинается с процесса фосфоролиза его, т. е. ферментативного распада, протекающего с участием неорганической фосфорной кисло-

ты. Эта реакция обуславливается присутствующим в мышечной ткани ферментом, называемым фосфорилазой, или фосфоролазой. Он представляет собой белок, полученный в кристаллическом виде в двух модификациях А и В, из которых модификация В является веществом, образующимся при распаде фосфорилазы А. Фосфорилаза А — электрофоретически гомогенный белок с молекулярным весом 495 000 — образует мелкие шелковистые блестящие кристаллы. Фосфорилаза В обладает молекулярным весом 242 000, более растворима, чем А, кристаллизуется из раствора, содержащего сернокислый аммоний и цистеин; обладает активностью лишь при до-ри-лаза В активируется киназной реакцией, приводящей к образованию АДФ и фиксации 4 остатков фосфорной кислоты в составе фосфорилазы А:



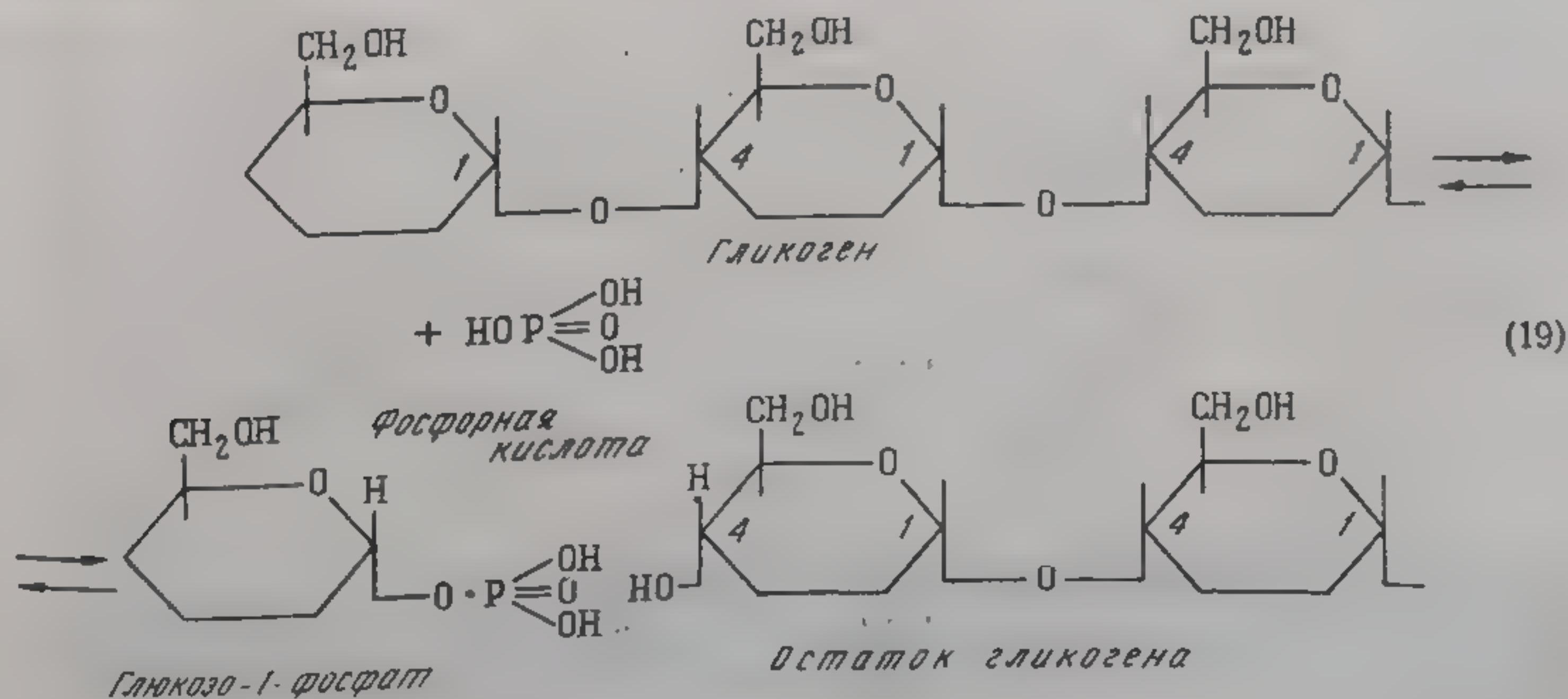
По-видимому, большую роль в активации фосфорилазы В и превращении ее в фосфорилазу А играет циклическая форма адениловой кислоты, которая в свою очередь стимулирует киназную реакцию. Влияние гормонов — адреналина и глюкагона — на образование фосфорилазы А также, по-видимому, сводится к образованию при этом циклической формы адениловой кислоты.



циклическая форма 3,5-адениловой кислоты

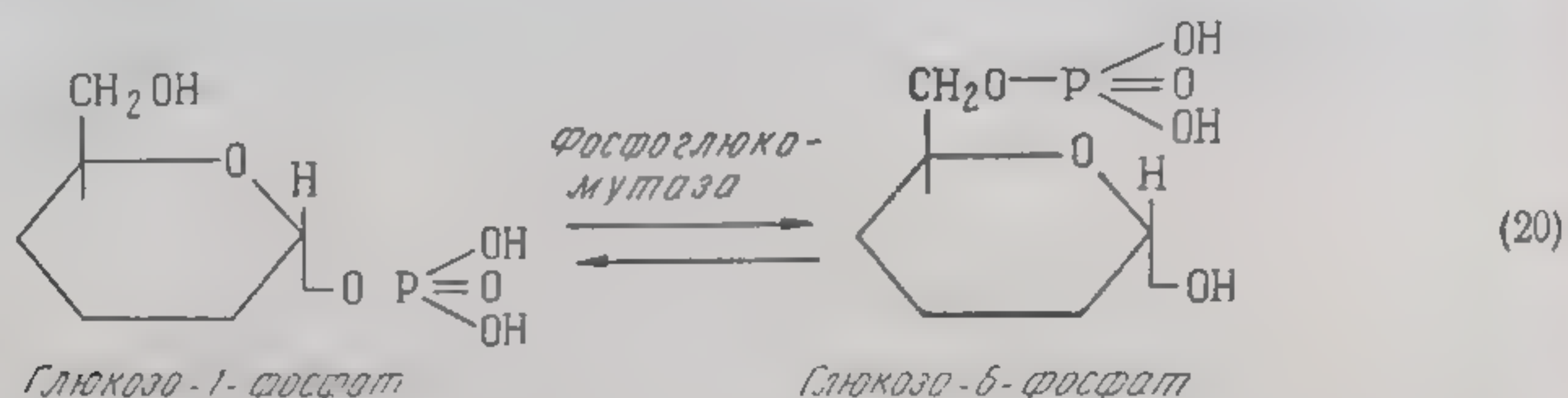
Совершенно неожиданным оказалось открытие в составе мышечной фосфорилазы пиродоксальфосфата в качестве простетической группы.

Под влиянием фосфорилазы происходит отщепление от гликогена остатков глюкозы, расположенных на конце основной цепи молекулы полисахарида или ее разветвлений. Разрыв по α -глюкозидной связи осуществляется при участии фосфорной кислоты с освобождением глюкозы, участвовавшей в соединении своим первым углеродным атомом. При этом образуется глюкозо-1-фосфат и молекула полисахарида укорачивается на один глюкозный остаток.



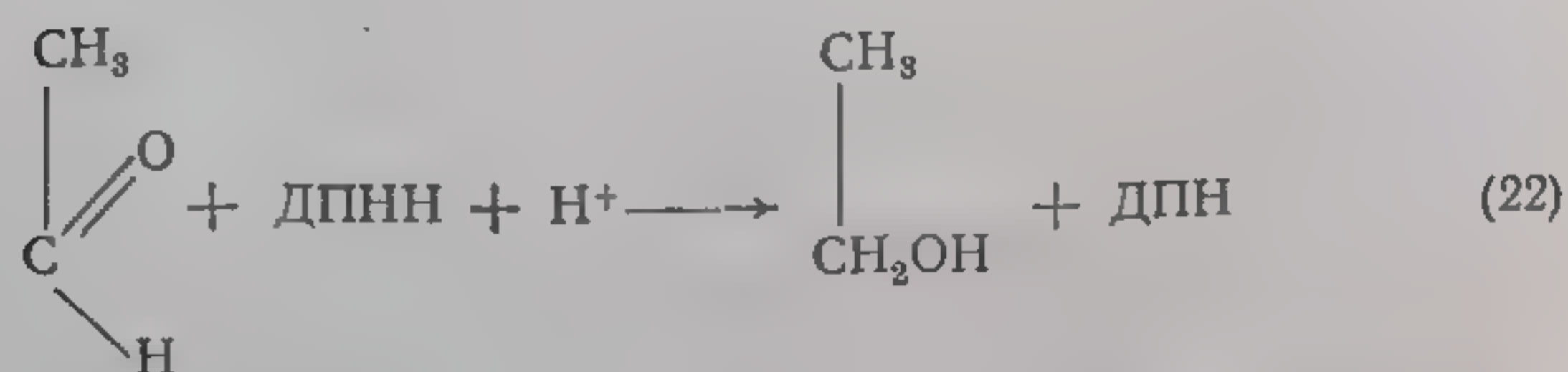
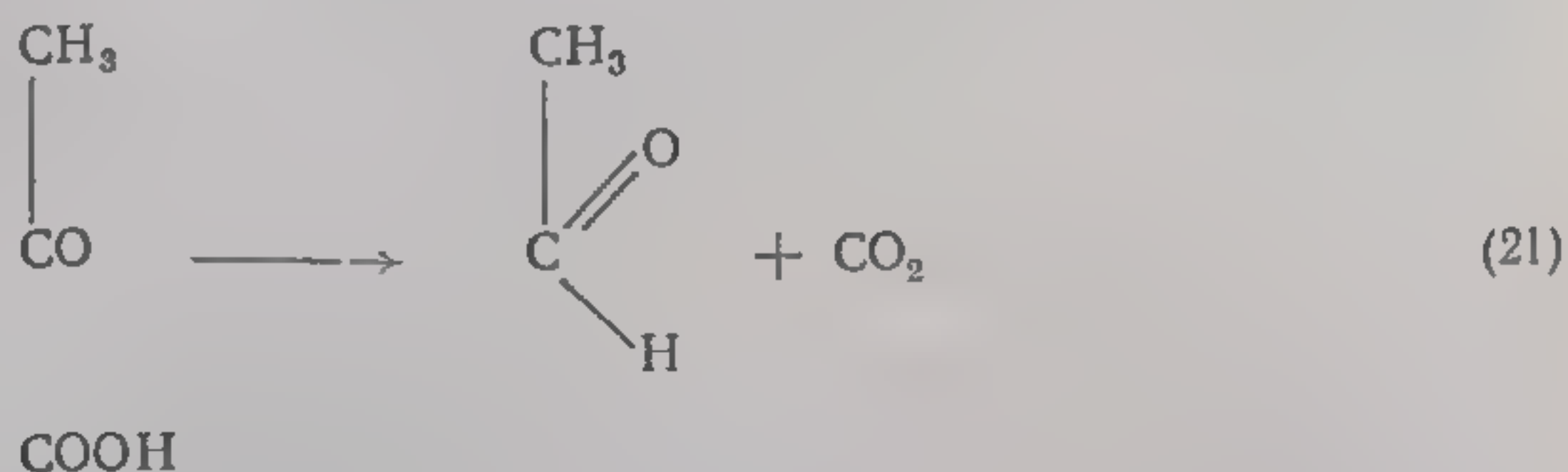
Эта реакция обратима и, следовательно, при наличии глюкозо-1-фосфата за счет того же фермента может иметь место дальнейшее усложнение молекулы гликогена путем присоединения глюкозных остатков к концевым группам основной цепи полисахарида или ее боковых ответвлений с освобождением минерального фосфата. Оптимум pH для этой реакции 6,3—6,5.

Р. Дальнейшим шагом в процессе гликогенолиза является переход глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат. Ферментом, катализирующим данную реакцию, является фосфоглюкомутаза, проявляющая свою активность в присутствии ионов Mg и приводящая к равновесию между двумя эфирами глюкозы, сдвинутому в сторону глюкозо-6-фосфата (20 : 1). Фосфоглюкомутаза — электрофоретически гомогенный белок с молекулярным весом 77 000, кристаллизуется в виде длинных, тонких, очень хрупких пластинок с оптимумом активности при pH 7,5. Коферментом фосфоглюкомутазы является глюкозо-1,6-дифосфат, всегда присутствующий в мышечной ткани, однако в незначительных количествах. Механизм реакции аналогичен описанному для реакции перехода 3-фосфоглицериновой кислоты в 2-фосфоглицериновую кислоту.



Весь путь анаэробного превращения углеводов, начиная с гликогена или глюкозы, схематически представлен на схеме стр. 167.

Следует упомянуть, что процесс сбраживания углеводов идет таким же путем, как и гликолиз, и лишь после образования пировиноградной кислоты проявляются характерные различия. Они заключаются в том, что в составе дрожжевых клеток содержится декарбоксилаза пировиноградной кислоты, активная в анаэробных условиях. Благодаря этому образуется уксусный альдегид, выступающий в качестве акцептора водорода с восстановленного дифосфопиридиннуклеотида.



Последняя реакция катализируется алкогольдегидрогеназой — ферментом, полученным в кристаллическом виде и представляющим собой электрофоретически гомогенный белок с молекулярным весом 150 000.

Суммарное уравнение для процесса брожения может быть изображено в следующем виде:

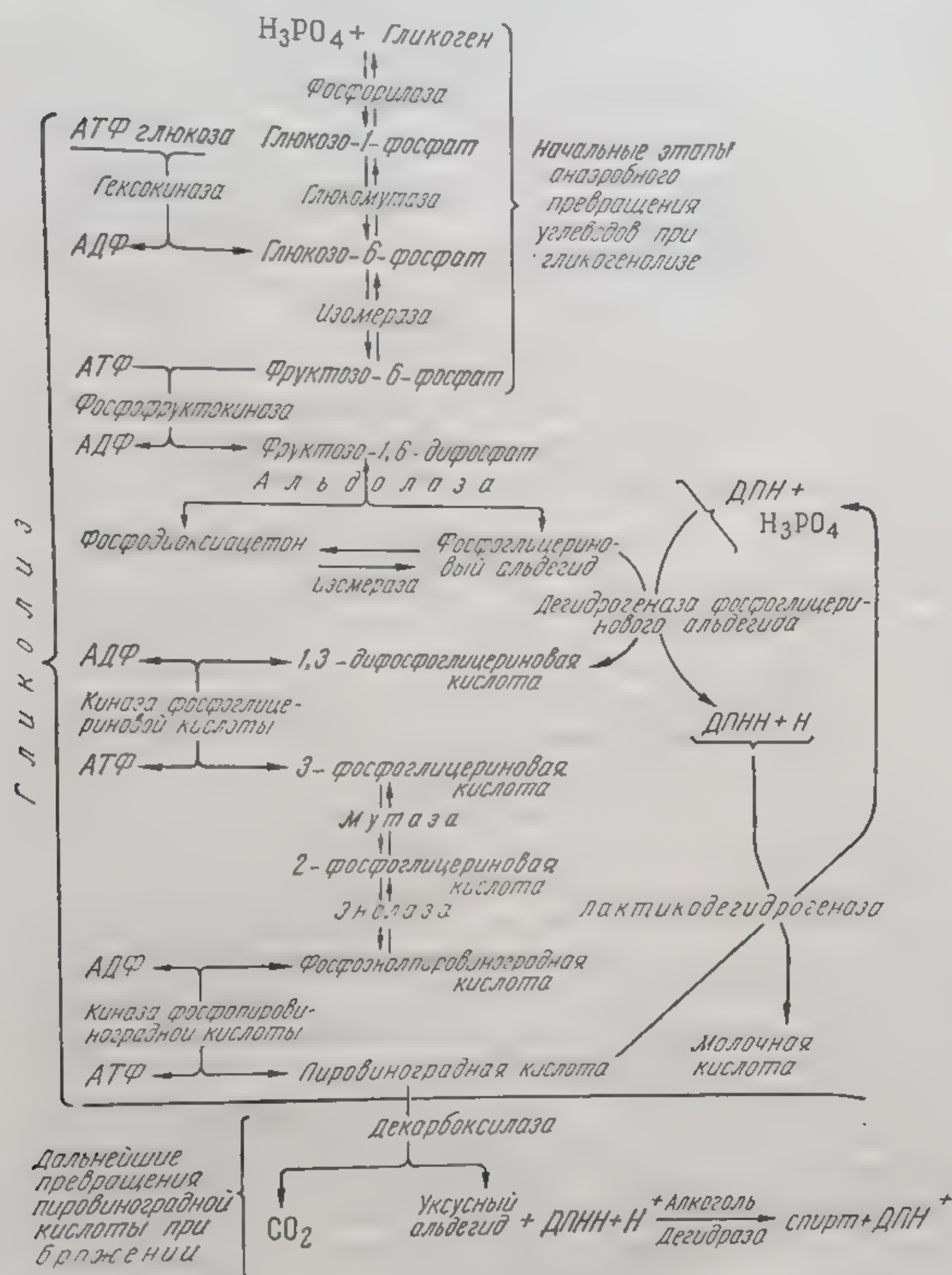
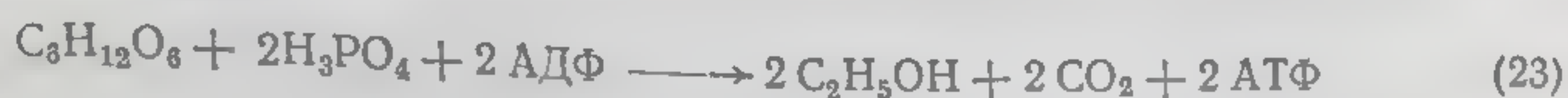
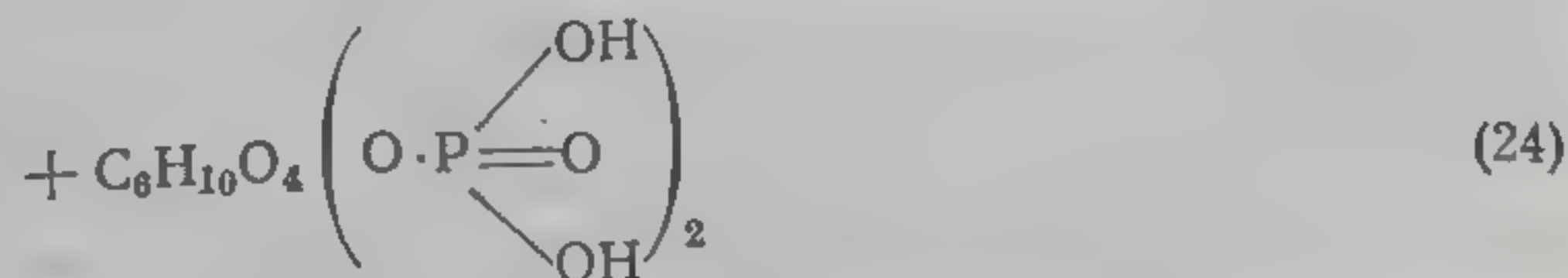


Схема анаэробного расщепления углеводов.

По указанному уравнению (23) процесс брожения протекает в присутствии дрожжевых клеток. При использовании дрожжевого сока процесс прекращается, когда половина добавленной глюкозы превратится в спирт и углекислый газ, а вторая половина — во фруктозодифосфат (уравнение Гарден и Йонга).



Своеобразие течения процесса брожения в присутствии дрожжевого сока объясняется недостатком акцептора фосфата. Добавление фермента, расщепляющего АТФ, например картофельной апиразы, дает возможность

и при использовании дрожжевого сока, согласно работе В. А. Энгельгардта и И. Ф. Сейца, довести процесс брожения до превращения всей глюкозы в спирт и CO_2 .

На приведенной схеме (см. стр. 167) указано отличие процесса брожения от процесса гликолиза.

Процесс анаэробного распада углеводов в различных органах и тканях животного организма отличается рядом характерных особенностей. Так, например, для ткани печени обычное течение гликогенолиза изменяется благодаря присутствию ферментов фосфатаз, обуславливающих расщепление фосфорных эфиров, начиная с глюкозо-1-фосфата и кончая фруктозодифосфатом. Образовавшийся при фосфоролизе гликогена глюкозо-1-фосфат лишь частично успевает перейти в глюкозо-6-фосфат; большая же его часть, подвергаясь расщеплению, является источником свободной глюкозы. Совершенно так же образуется свободная глюкоза при расщеплении глюкозо-6-фосфата. Под влиянием соответствующих фосфатаз распадается также фруктозодифосфат и фруктозомонофосфат. Благодаря этим процессам обеспечивается поступление в кровь свободной глюкозы и фруктозы и транспорт их в органы и ткани.

Своеобразно осуществляется анаэробный распад глюкозы в эритроцитах. В этих клетках значительной активностью обладает фосфомутаза, обуславливающая превращение 1,3-дифосфоглицериновой кислоты в 2,3-дифосфоглицериновую. Последнее соединение накапливается в эритроцитах и является их характерной составной частью. Можно полагать, согласно данным С. Рапопорт, что различие в процессе гликолиза между мышцами и эритроцитами заключается в следующем: в мышечной ткани фермент — мутаза, обуславливающий превращение 1,3-дифосфоглицериновой кислоты в 2,3-дифосфоглицериновую, обладает малой активностью; в то же время относительно большей активностью характеризуется фосфатаза, под влиянием которой происходит отщепление одного из двух остатков фосфорной кислоты, имеющих в составе 2,3-дифосфоглицериновой кислоты. В эритроцитах отношения обратные, т. е. значительной активностью обладает мутаза и слабой — фосфатаза. Это и обуславливает накопление в эритроцитах 2,3-дифосфоглицериновой кислоты.

Некоторыми особенностями характеризуется анаэробный обмен углеводов и в мозговой ткани. Главным субстратом в этом случае является не гликоген, а глюкоза. Однако присутствующая в составе нервной ткани фосфоглюкомутаза может обеспечить в определенных условиях образование глюкозо-1-фосфата, участвующего под влиянием фосфорилазы в синтезе гликогена.

Много работ посвящено определению скорости отдельных реакций гликолиза с целью выяснения наиболее медленной из них, характеризующей скорость процесса в целом.

Для характеристики активности фермента обычно пользуются величинами, выражающими количество грамм-молей субстрата, вовлеченного в реакцию в течение 1 минуты действия 1 г/моля фермента. Результаты этих вычислений выражают «число оборотов» фермента. Ниже приведена табл. 1, взятая из работы А. И. Колотиловой. Однако для суждения об активности фермента в ткани важно не только знать число оборотов, но и концентрацию фермента в исследуемом объекте. Эти данные приведены в табл. 2. В ней указана активность ферментов, выраженная в микромолях субстрата реакции при $37-40^\circ$, отнесенная к 1 г сырого веса мышцы. По-видимому, в разных тканях, а также в различных условиях фактором, ограничивающим скорость гликолитического процесса в целом, может являться активность различных ферментов. В том случае, когда процесс начинается фосфорилизацией глюкозы, ограничивающим фактором служит активность

Таблица 1

Активность изолированных ферментов гликолитического комплекса мышц в числах оборотов ферментов, выраженных количеством грамм-молей субстрата, вовлеченного в реакцию за 1 минуту действия 1 грамм-моля фермента (по А. И. Колотиловой)

Фермент	Число оборотов	Температура
Гексокиназа	13 000	30°
Фосфоглюкомутаза	16 800	30°
Фосфофруктокиназа	1 400	
»	350	37°
Альдолаза	1 000	
»	1 670	30°
Триозофосфатизомеразы	1 000 000	38°
Триозофосфатдегидрогеназа	6 700	27°
Фосфофераза 1,3-дифосфоглицериновой кислоты	320 000	25°
Энолаза	9 900	20°
Фосфофераза фосфоэнолпировиноградной кислоты	6 000	20°
Лактикодегидрогеназа	28 900	25°

Таблица 2

Активность ферментов в расчете на 1 минуту действия при 37—40° и 1 г сырого веса мышцы (по А. И. Колотиловой)

Фермент	Субстрат, в микромолях
Фосфорилаза	$1,2 \cdot 10^2$
Фосфоглюкомутаза	$1,3 \cdot 10^1$
Гексокиназа	$1,5 \cdot 10^0$
Фосфогексоизомеразы	$8,3 \cdot 10^1$
Фосфофруктокиназа	$5,1 \cdot 10^0$
Альдолаза	$5,5 \cdot 10^1$
Триозофосфатизомеразы	$9,3 \cdot 10^3$
Триозофосфатдегидрогеназа:	
pH 7,1	$6,0 \cdot 10^1$
pH 8,6	$4,0 \cdot 10^2$
Энолаза	$7,2 \cdot 10^1$
Фосфофераза фосфоэнолпировиноградной кислоты	$2,3 \cdot 10^2$
Лактикодегидрогеназа	$3,0 \cdot 10^2$

гексокиназы. При процессе гликогенолиза, когда в последовательных превращениях углевода гексокиназа не принимает участия (см. схему на стр. 167), наименьшей скоростью обладает реакция, катализируемая фосфофруктокиназой. В отношении мышечной ткани эти данные были убедительно продемонстрированы в работе А. С. Нейфаха.

Для эритроцитов реакцией, ограничивающей скорость процесса в целом, если не непосредственно, то косвенно, служит процесс гликолитической оксидоредукции (А. И. Колотилова).

Нельзя однако не учитывать того обстоятельства, что скорость каждой отдельной реакции, а также и процесса в целом испытывает влияние со стороны различных соединений, присутствующих в тканях. Это относится и к концентрации водородных ионов, изменение которой весьма различно влияет на отдельные ферментативные реакции и состояние равновесия прямого

и обратного процессов. Концентрация других ионов имеет также большое значение: некоторые из них могут ускорять одну реакцию, оказывая тормозящее влияние на другую и, таким образом, определять скорость течения процесса. Мощное воздействие на активность ферментов оказывают и гормональные факторы, причем одни из них подавляют активность ферментов, другие снимают это задерживающее действие.

Из сказанного следует, что правильно установить фактическую скорость гликолитического процесса в той или иной ткани, при том или ином состоянии организма, а также выявить, какие именно звенья в цепи анаэробных превращений углеводов определяют скорость этого процесса, весьма трудно.

Большое внимание уделено выяснению энергетической эффективности гликолитического процесса. Энергия, освобождающаяся при образовании в анаэробных условиях молочной кислоты из глюкозы или из глюкозного остатка гликогена, лишь частично аккумулируется в богатых энергией фосфорных связях аденозинтрифосфорной кислоты. Эта энергия является тем запасом, который может быть утилизирован на любые функциональные отправления клеток и тканей, будет ли это процесс биосинтеза какого-либо сложного соединения или проявление функциональной активности, характерной для данной ткани, например сокращение мышечного волокна, проведение нервного импульса, секреторная деятельность и т. д. Другая часть энергии рассеивается в виде тепловой при отдельных реакциях гликолитического процесса. Согласно исследованиям Г. Е. Владимирова и его сотрудников, изменение свободной энергии при промежуточных реакциях гликолиза при молярной концентрации веществ, участвующих в реакции при температуре 37° и pH 7,4, выражается величинами, приведенными в табл. 3.

Таблица 3
Изменения свободной энергии при промежуточных
реакциях гликолиза (по Г. Е. Владимирову)
Рассчитано для 37°, при pH 7,4 и для молярной концентрации
всех веществ, участвующих в реакции

№ п/п	Реакция	Изменения свободной энергии в ккал
1	Глюкоза + АТФ → глюкозо-6-фосфат + АДФ	—5,90
2	Глюкозо-6-фосфат → фруктозо-6-фосфат	+0,45
3	Фруктозо-6-фосфат + АТФ → фруктозо-1,6- дифосфат + АДФ	—5,60
4	Фруктозо-1,6-дифосфат → фосфоглицерино- вый альдегид + фосфодиоксиацетон	+5,60
5	Фосфодиоксиацетон → фосфоглицериновый альдегид	+1,90
6	Фосфоглицериновый альдегид + фосфат + кодегидраза (окисленная) + АДФ → 3-фос- фоглицериновая кислота + кодегидраза (восстановленная) + АТФ	—5,00
7	3-фосфоглицериновая кислота → 2-фосфогли- цериновая кислота	+1,05
8	2-фосфоглицериновая кислота → фосфопиро- виноградная кислота + H ₂ O	—0,70
9	Фосфопировиноградная кислота + АДФ → пировиноградная кислота + АТФ	—4,75
10	Пировиноградная кислота + кодегидрогеназа (восстановленная) → молочная кислота + ко- дегидрогеназа (окисленная)	—4,40

Указанные данные не могут, однако, характеризовать изменение свободной энергии для физиологического состояния ткани. Это связано с тем, что физиологические концентрации исходных, промежуточных и конечных продуктов гликолиза резко отличаются от молярной концентрации, использованной при расчетах результатов, приведенных в табл. 3. Ориентировочные данные, приводимые Г. Е. Владимировым о физиологических концентрациях продуктов гликолиза, помещены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4

Ориентировочные данные для физиологических концентраций исходных, промежуточных и конечных продуктов гликолиза (по Г. Е. Владимирову)

Вещество	Концентрация в г/моль на 1 л
Глюкоза	0,005
Неорганический фосфат	0,010
Глюкозо-6-фосфат	0,003
Фруктозо-6-фосфат	0,001
Фруктозо-1,6-дифосфат	0,001
Фосфодиоксиацетон	0,0015
Фосфоглицериновый альдегид	0,00005
3-фосфоглицериновая кислота	0,0015
2-фосфоглицериновая кислота	0,0002
Фосфопировиноградная кислота	0,0005
Пировиноградная кислота	0,0001
Молочная кислота	0,002

Если использовать материалы табл. 4 и рассчитать изменение свободной энергии при промежуточных реакциях гликолиза, то мы получим данные, резко отличающиеся от ранее приведенных. Изменения свободной энергии при промежуточных реакциях гликолиза, вычисленные Г. Е. Владимировым для физиологических концентраций веществ, участвующих в реакциях при температуре 37° и рН 7,4, приведены в табл. 5. Все расчеты сделаны на одну молекулу глюкозы и, следовательно, для двух молекул трехуглеродных соединений. При суммировании изменений свободной энергии отдельных реакций гликолиза (табл. 5) получается величина, равная 29,9 ккал. Следовательно, это количество свободной энергии рассеивается в виде тепла, а накапливается в легко утилизируемой форме количество энергии, соответствующее двум богатым энергией фосфатным связям в АТФ (по одной на каждую из двух молекул АТФ согласно уравнению 16). Если оценивать энергию фосфатной связи конечного остатка фосфорной кислоты в АТФ, равной 10 ккал, то накопление энергии будет равно 20 ккал, а рассеяние энергии — 29,9 ккал. Таким образом, в лучшем случае, полезный эффект составит около 40%. Согласно новейшим данным, свободная энергия гидролиза конечной фосфатной связи АТФ составляет около 5 ккал/м. Тогда, следовательно, эффективность процесса гликолиза еще меньше.

При процессе гликогенолиза в виде макроэргических фосфатных связей накапливаются не две, а три частицы фосфорной кислоты и энергетическая эффективность гликогенолиза может считаться несколько более высокой, чем для процесса гликолиза. Однако следует иметь в виду, что в синтезе гликогена участвует глюкозо-1-фосфат, который в свою очередь образуется в результате глюкомутазной реакции из глюкозо-6-фосфата. Образование же глюкозо-6-фосфата из глю-

Таблица 5

Изменения свободной энергии при промежуточных реакциях гликолиза (по Г. Е. Владимирову)

№ п/п	Реакция	Изменения свободной энергии в ккал
1	Глюкоза + АТФ → глюкозо-6-фосфат + АДФ	— 6,2
2	Глюкозо-6-фосфат → фруктозо-6-фосфат . . .	— 0,2
3	Фруктозо-6-фосфат + АТФ → фруктозо-1,6-дифосфат + АДФ	— 5,9
4	Фруктозо-1,6-дифосфат → фосфоглицериновый альдегид + фосфодиоксиацетон	— 0,3
5	Фосфодиоксиацетон → фосфоглицериновый альдегид	— 0,2
6 ¹	Фосфоглицериновый альдегид + фосфат + ко-дегидраза (окисленная) + АДФ → 3-фосфоглицериновая кислота + кодегидраза (восстановленная) + АТФ	— 0,1
7	3-фосфоглицериновая кислота → 2-фосфоглицериновая кислота	— 0,4
8	2-фосфоглицериновая кислота → фосфопировиноградная кислота + H ₂ O	— 0,2
9	Фосфопировиноградная кислота + АДФ → пировиноградная кислота + АТФ	— 11,4
10	Пировиноградная кислота + кодегидрогеназа (восстановленная) молочная кислота + кодегидрогеназа (окисленная)	— 5
Всего . . .		— 29,9

¹ Начиная с реакции 6, изменения свободной энергии удвоены, так как расчет идет на 2 моля трехуглеродных соединений, соответствующих 1 молю глюкозы.

козы при участии гексокиназы осуществляется с использованием одной молекулы АТФ (реакция 1)¹.

Хорошо известны обратные отношения между брожением и дыханием, описанные еще Пастером. Атмосфера кислорода для большинства животных тканей и клеток отрицательно влияет на интенсивность анаэробного распада углеводов и образование молочной кислоты. Задержка гликолиза в клетках в присутствии кислорода или отрицательное влияние поглощения кислорода — дыхания — на образование молочной кислоты получило название эффекта Пастера. Следует обратить внимание, что одним и тем же названием «эффект Пастера» обозначают разные явления: 1) задерживающее влияние атмосферы кислорода на процесс гликолиза, протекающий в системе, где не может быть поглощения кислорода или клеточного дыхания, например в дрожжевом или мышечном соке, и 2) обратные отношения между гликолизом и дыханием — в системах, где оба процесса могут иметь место, т. е. где содержатся ферменты как анаэробного превращения углеводов, так и клеточного дыхания и где сохранены структурные элементы клетки.

Задерживающее влияние атмосферы кислорода на гликолиз отмечалось рядом авторов. Некоторые из них указывали на повреждение ферментов гликолиза во всех случаях повышения окислительного потенциала в системе, не фиксируя точно те звенья в цепи ферментативных реакций гликоли-

¹ В настоящее время основным путем синтеза гликогена считается трансглюкозилная реакция, осуществляющаяся при участии уридиндифосфатглюкозы.

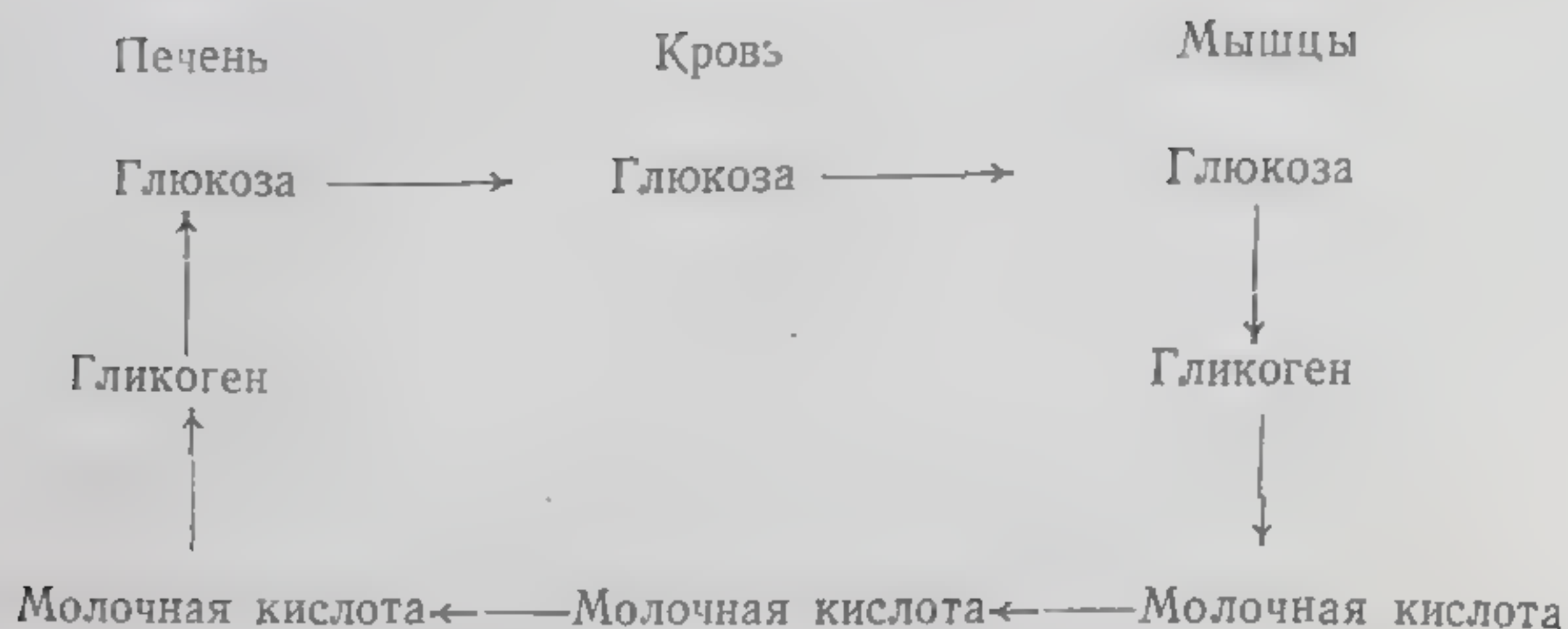
за, которые оказываются наиболее чувствительными к окислению. Другие авторы, в частности В. А. Энгельгардт и Н. Е. Саков (1943), указывали, что таким звеном является фосфофруктокиназная реакция, которая тормозится при повышении окислительного потенциала, чем бы это повышение ни вызывалось. Следствием торможения фосфофруктокиназной реакции было, во-первых, торможение образования фруктозодифосфата — типичного субстрата анаэробных превращений и, во-вторых, как думали авторы, переключение процесса на путь прямого окисления глюкозо-6-фосфата. Чувствительность ферментов гликолиза и, в частности, фосфофруктокиназы к повышению окислительно-восстановительного потенциала системы не вызывает сомнений. Однако это не может объяснить весьма разнообразные моменты, касающиеся обратных отношений, существующих между дыханием и брожением в системах, более близких к физиологическим, чем дрожжевой или мышечный сок, где вообще дыхание отсутствует.

При оценке тех многочисленных толкований, которые были предложены для объяснения задержки гликолиза дыханием, следует подчеркнуть, что эти процессы обладают многими общими чертами. Оба процесса характеризуются эстерификацией минерального фосфата, образованием АТФ, превращением ДПН в ДПНН и обратно, участием ферментов, активность которых зависит от свободных SH-групп в них и т.д. По-видимому, для объяснения пастеровского эффекта не следует искать единого механизма. В разных случаях он может быть обусловлен разными причинами, причем наиболее существенными из них будут конкурентные отношения между активностью ферментов, концентрациями субстратов и коферментов, а также минеральных веществ, участвующих как в процессе гликолиза, так и дыхания. Кроме того, нельзя забывать, что эти процессы разобщены друг от друга в клеточных структурах. Ферменты гликолиза находятся в жидкой части клеточной протоплазмы, а процессы окисления и участвующие в них ферменты сосредоточены в митохондриях. В зависимости от различного соотношения активностей ферментов и содержания субстратов и коферментов в одних случаях окажется выраженным прямой пастеровский эффект, т. е. подавление дыханием процесса гликолиза, например в результате снижения концентрации минерального фосфата в гиалоплазме и отсутствия в ней достаточного количества АДФ. В других случаях будет преобладать эффект Крабтри, или так называемый обратный пастеровский эффект, — подавление дыхания при добавлении глюкозы. В этом случае конкурентные отношения проявляются на другом участке — именно между акцепторами водорода: например, высокие концентрации пирувата при большой активности лактикодегидрогеназы способны помешать транспортированию водорода на молекулярный кислород и уменьшить интенсивность дыхания.

Теперь остается осветить последний из намеченных вопросов и кратко остановиться на разборе судьбы образовавшейся при гликолизе молочной кислоты. Основным местом ее образования является мышечная ткань, в которой, особенно при интенсивной и кратковременной работе, она образуется в значительном количестве. Большая часть кислоты поступает в печень и превращается в гликоген по пути, обратному гликолизу. Энергия для этого синтеза черпается из окислительных процессов, протекающих в печени. Таким образом, обеспечивается цикл превращений, получивший название цикла Кори. В мышце глюкоза превращается в гликоген, который путем гликогенолиза превращается в молочную кислоту. Последняя поступает в кровь, доставляется в печень и превращается там в гликоген; гликоген является источником образующейся из него глюкозы, поступающей в кровь и доставляемой в мышечную ткань.

Считают, что $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{6}$ образовавшейся в мышцах молочной кислоты окисляется, а остальные $\frac{4}{5}$ — $\frac{5}{6}$ в печени ресинтезируются в гликоген. Процесс

Цикл Кори



ресинтеза гликогена протекает и в самой мышце, однако с меньшей интенсивностью.

Биологическое значение гликолиза и гликогенолиза заключается не только в том, что в результате распада углеводов образуются богатые энергией фосфорные соединения. Помимо этого, при гликолизе образуются вещества, используемые для целей синтеза, а также являющиеся основными субстратами для процессов окисления. В первую очередь это относится к пировиноградной и молочной кислотам, которые служат одними из главных субстратов окисления. Часто неправильно говорят об «окислении углеводов», когда в действительности имеют в виду продукты анаэробного распада углеводов и главным образом пировиноградную кислоту. Однако прежде чем рассмотреть процессы окисления продуктов анаэробного распада углеводов, следует ответить на вопрос, возможно ли прямое окисление углеводов без предварительного их гликолитического расщепления.

2. ПЕНТОЗНЫЙ ЦИКЛ (ПРЯМОЕ ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ)

С. Е. Северин

Вопрос о возможности прямого окислительного превращения глюкозы или ее фосфорных эфиров неоднократно привлекал к себе внимание, но решался по-разному в силу отсутствия прямых экспериментальных данных. В настоящее время уже не может вызывать сомнения реальность окислительного превращения глюкозы, так как не только получены многочисленные промежуточные продукты, при этом образующиеся, не только установлены ферменты, принимающие в нем участие, но и достаточно полно расшифрованы механизмы отдельных, протекающих при этом реакций.

Окислительное превращение глюкозы, получившее также название «апотомического пути», противопоставляется процессу гликолиза, особенно обстоятельно изученному в работах Эмбдена и Мейергофа и получившего вследствие этого название ЕМ (ЭМ) пути превращения. Так как многие детали процесса гликолиза описаны Парнасом, то иногда этот процесс называют также ЕМР (ЭМП) путь превращения. Изучение окислительного или апотомического пути превращения глюкозы начато экспериментальными исследованиями Варбурга в 1931 г., плодотворно развитыми им в период 1931—1937 гг.

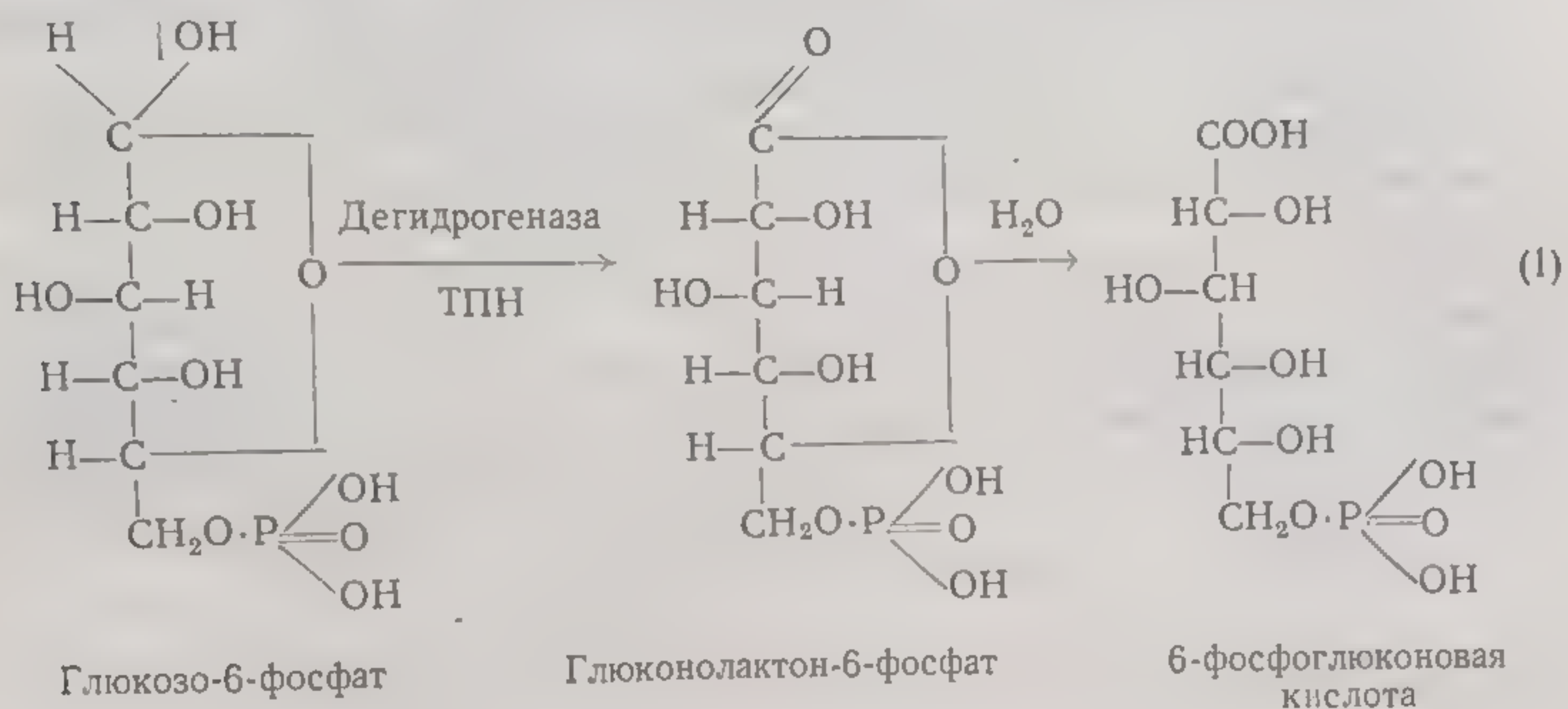
В исследованиях Липмана и особенно Диккенса, относящихся к 1936—1938 и последующим годам, окислительное превращение глюкозы изучено более детально. В связи с упомянутыми работами для совокупности разбираемых ниже реакций было дано сокращенное название — WLD — путь превращения глюкозы (ВЛД). Уместно упомянуть о том, что одновременно

с работами Диккенса были опубликованы работы В. А. Энгельгардта, в которых описывался тот же путь окислительного превращения глюкозы.

Впоследствии выяснилось, что центральным звеном в окислительных превращениях глюкозы является образование пентоз, вновь превращающихся через ряд промежуточных продуктов в гексозы. Указанное обстоятельство обусловило еще одно название для окислительного пути превращения глюкозы, а именно «пентозный цикл», которое постепенно вытеснило другие и является теперь наиболее принятым.

А. Пентозный цикл начинается с окисления глюкозо-6-фосфата при участии дегидрогеназы — фермента, широко распространенного в дрожжевых клетках, бактериях, растительных организмах, а также в органах и тканях животных.

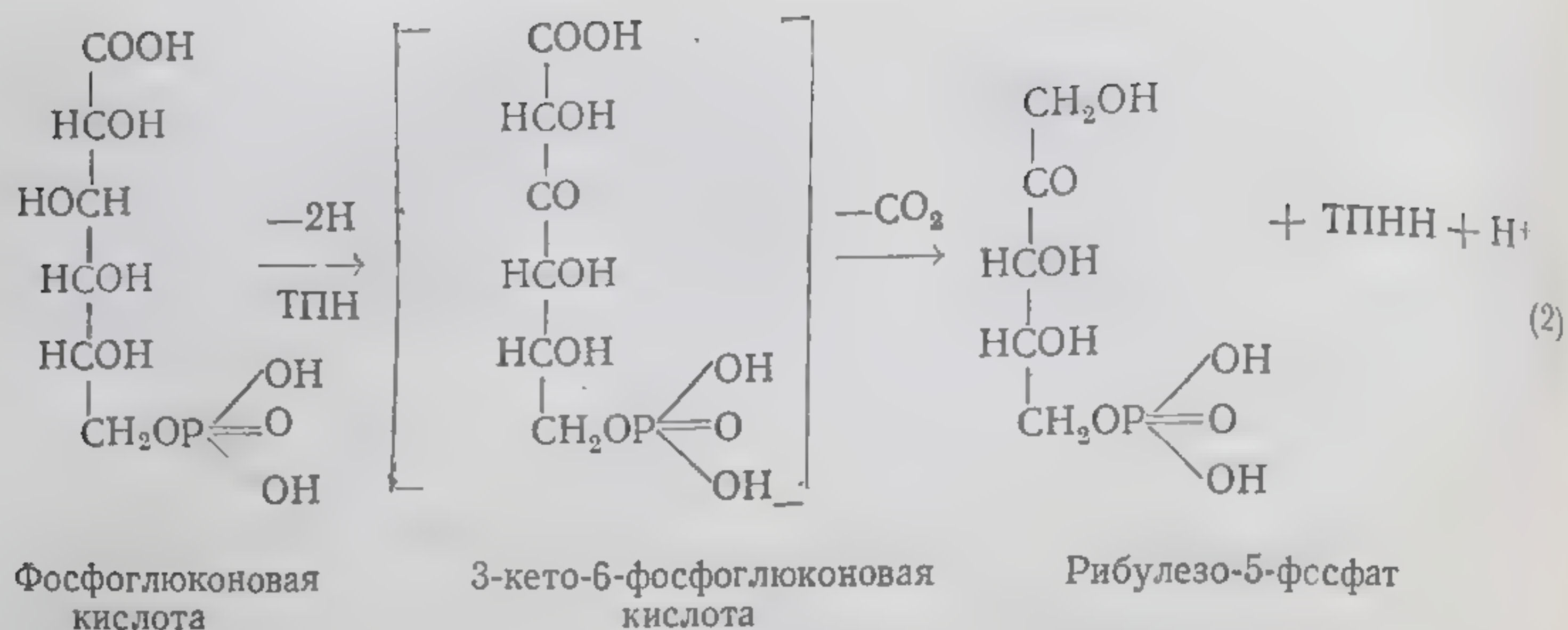
Коферментом служит ТПН, который, по крайней мере в животных тканях, не может быть замещен на ДПН, т. е. участие его в реакции является специфическим. Реакция протекает по уравнению:



Первый этап реакции, т. е. непосредственный акт дегидрирования, не сопровождается раскрытием пиранозного цикла, вследствие чего образуется лактон фосфоглюконовой кислоты, легко обнаруживающийся по его способности в присутствии гидроксиламина давать положительную гидроксамовую пробу.

Б. Образование фосфоглюконовой кислоты из лактона может протекать спонтанно, однако надлежащая скорость этого процесса обеспечивается специальным ферментом — лактоназой, вызывающей гидролитическое расщепление лактона. Помимо фосфоглюконовой кислоты, в результате окисления глюкозо-6-фосфата образуется восстановленная форма трифосфориндиннуклеотида $\text{ТПНН} + \text{H}^+$.

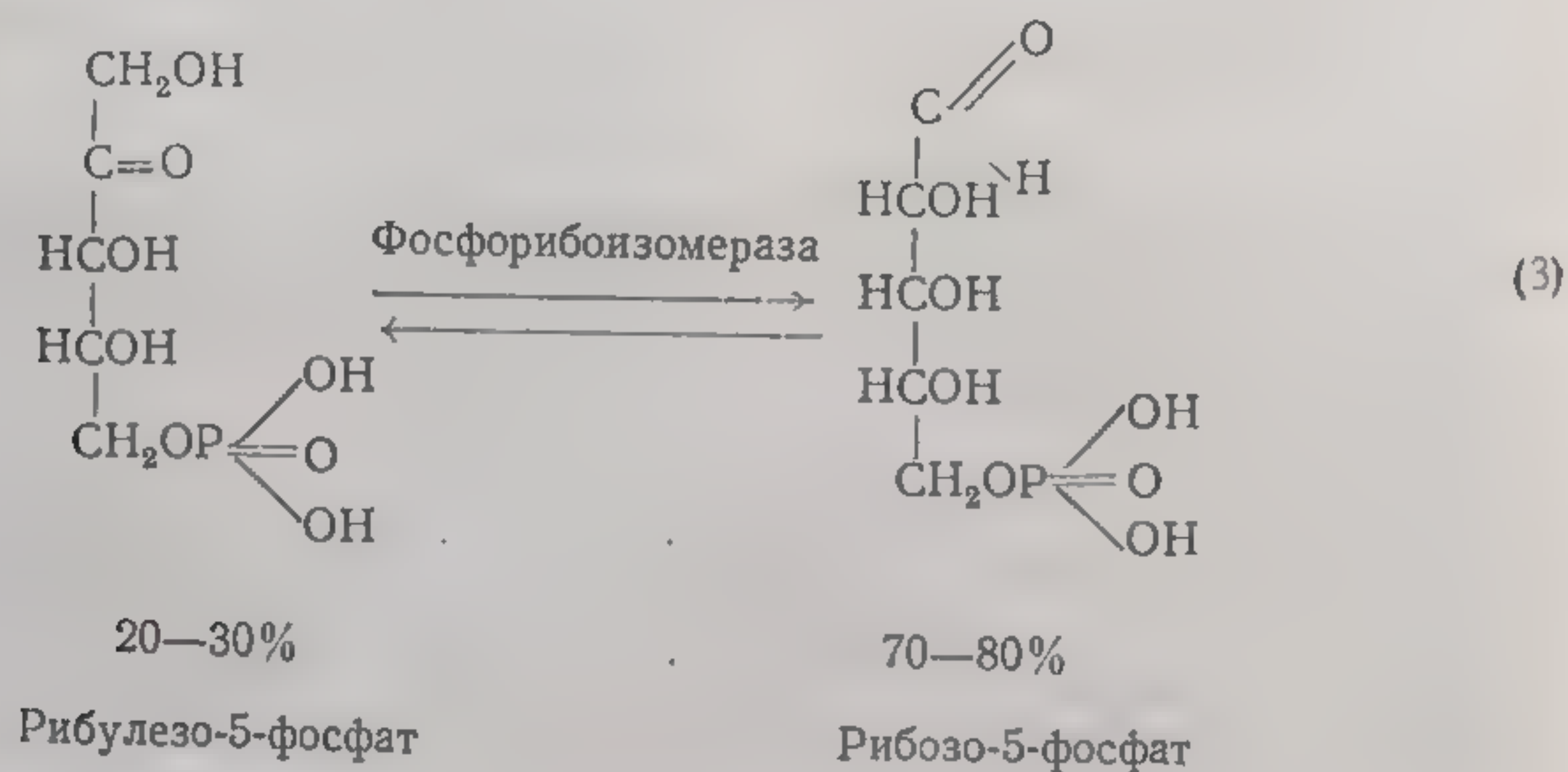
В. Следующий шаг в пентозном цикле заключается в окислении фосфоглюконовой кислоты при участии дегидрогеназы, коферментом которой также является ТПН. Это окисление сопровождается декарбоксилированием шестиуглеродного соединения, приводящим в зависимости от длительности инкубации к разным продуктам: при кратковременной инкубации обнаруживается по преимуществу рибулезосфосфат, при длительной — рибозосфосфат. Следовательно, непосредственным продуктом декарбоксилирования фосфоглюконовой кислоты следует признать кетоформу пентозы. Предшествует ли реакции декарбоксилирования фосфоглюконовой кислоты образование ее кетопроизводного, остается неясным, в связи с чем 3-кето-6-фосфоглюконовую кислоту можно считать лишь гипотетическим промежуточным участником реакции:



Возможно, что не 3-кето-6-фосфоглюконовая кислота является промежуточным продуктом, а соответствующий 2—3-эндиол, хотя это заключение Диккенса и Глок является также только гипотетическим.

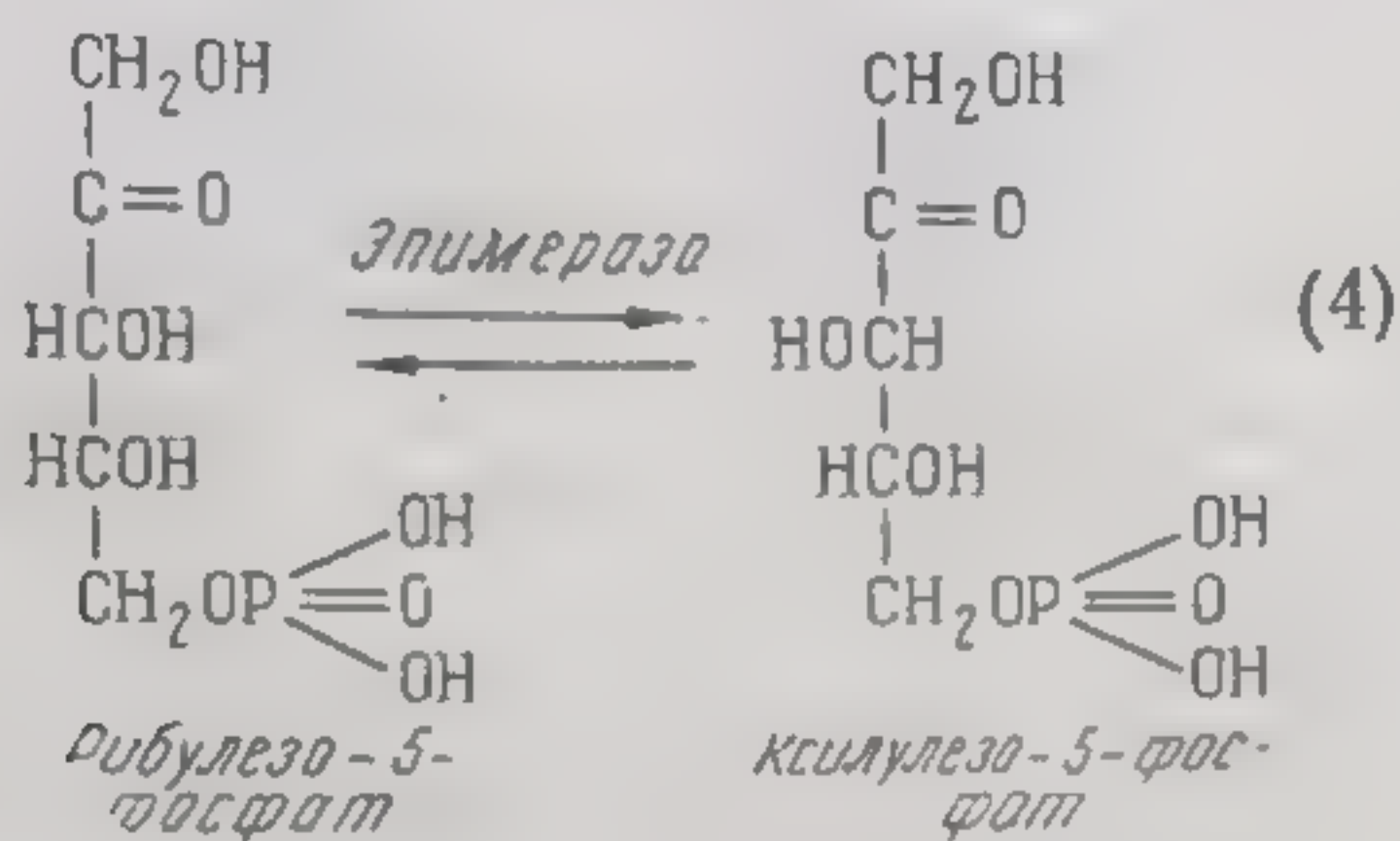
Фермент наиболее активен при pH 7,4. Коферментом дегидрогеназы фосфоглюконовой кислоты, так же как и дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата, является ТПН.

Г. Между рибулезо-5-фосфатом и рибозо-5-фосфатом устанавливается равновесие благодаря действию фермента — пентозофосфатизомеразы, обладающей максимальной активностью при pH 7,0. Равновесие между двумя фосфорными эфирами пентоз сдвинуто в сторону рибозо-5-фосфата, на долю которого приходится 70—80%, в то время как на долю первоначального продукта окисления и декарбоксилирования фосфоглюконовсй кислоты — рибулезо-5-фосфата — остается только 20—30%.

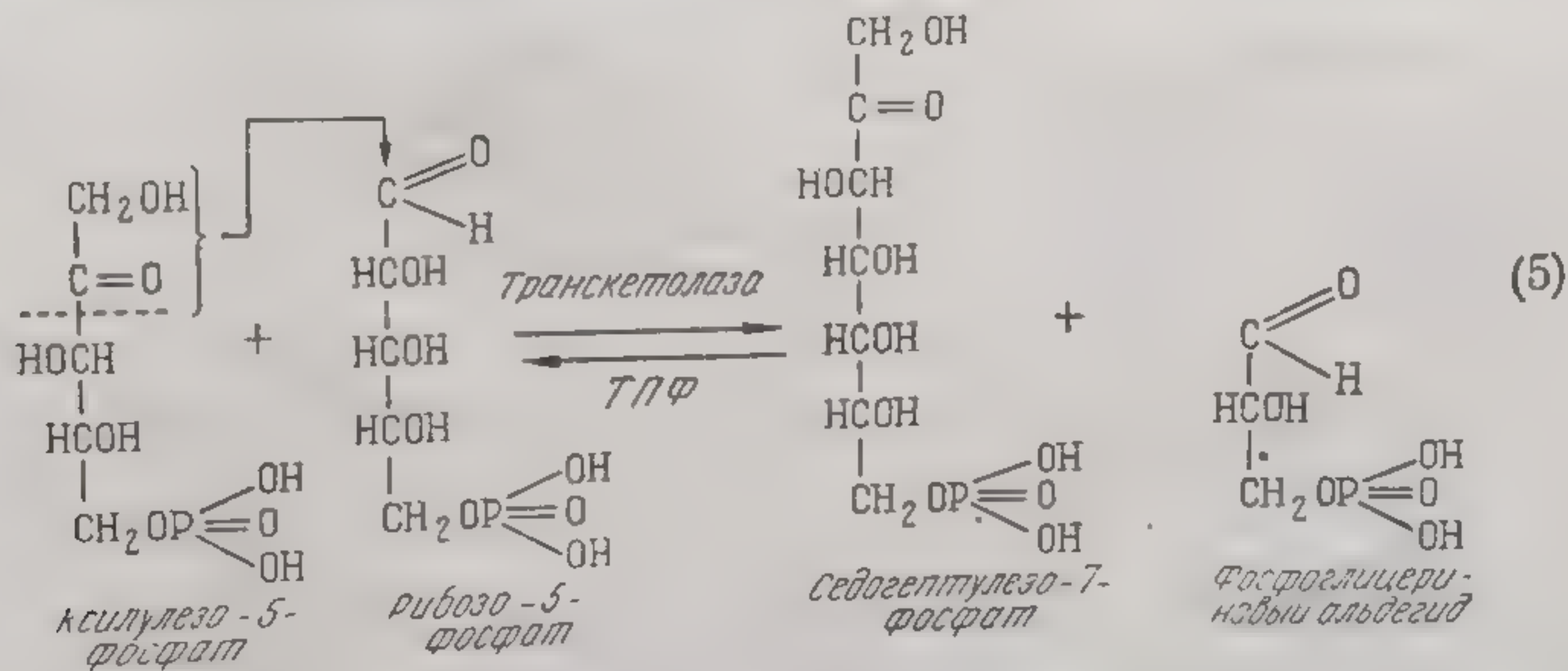


Д. Особенно сложными для анализа и расшифровки оказались последние этапы реакций. В ближайшем из них, как выяснилось, участвуют оба изомера фосфопентоз. В результате реакции удастся установить образование компонента, содержащего три углеродных атома и представляющего собой фосфотриозу. Процесс происходит быстрее, если присутствует не только фосфорибоза, но и фосфорибулеза. Обнаружить фрагмент, состоящий из двух углеродных атомов, не удалось. Это затруднение вскоре было преодолено, так как было описано фосфорное соединение, содержащее 7 углеродных атомов. Тогда уравнение реакции было представлено в следующем виде: 2 молекулы пентозофосфата → седогептулезофосфат (7 углеродных атомов) + фосфоглицериновый альдегид.

В результате дальнейшего детального изучения строения продуктов реакции был сделан вывод, что седогептулезосфат образуется в результате разрыва связей в одной из молекул пентозы между 2-м и 3-м атомом углерода и переноса двууглеродного фрагмента на рибозофосфат. Конфигурация образовавшегося продукта конденсации указывала на то, что донатором двууглеродного фрагмента может быть, по-видимому, ксилулезо-5-фосфат и, следовательно, прежде чем произойдет реакция, получившая наименование «транскетолазной», должен осуществиться переход рибулезо-5-фосфата путем эпимеризации в ксилулезо-5-фосфат. Итак, в равновесную систему рибозо- и рибулезофосфатов вмешивается еще реакция эпимеризации, в которую вовлекается рибулезо-5-фосфат:

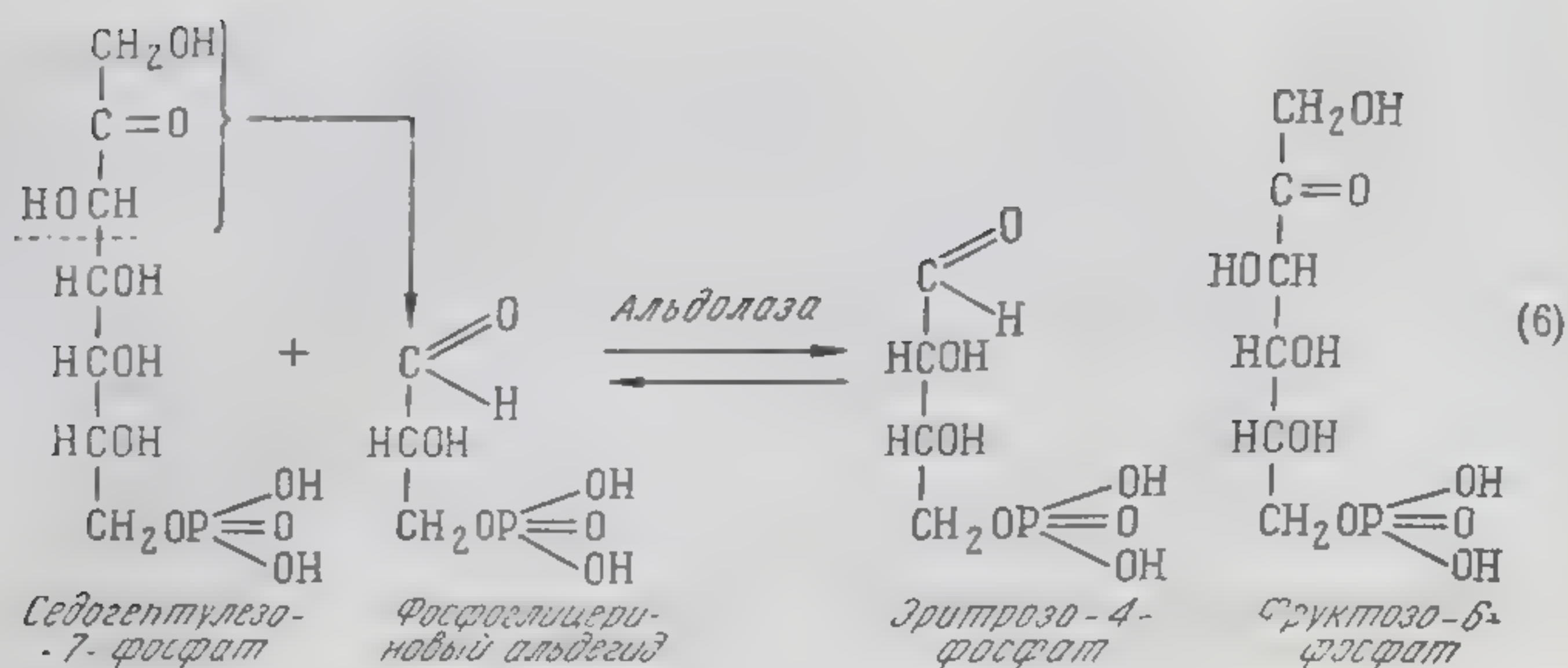


Считают, что непосредственным донором двууглеродного фрагмента как раз и является ксилулезо-5-фосфат, а акцептором — рибозо-5-фосфат, т. е. реакция протекает согласно уравнению:



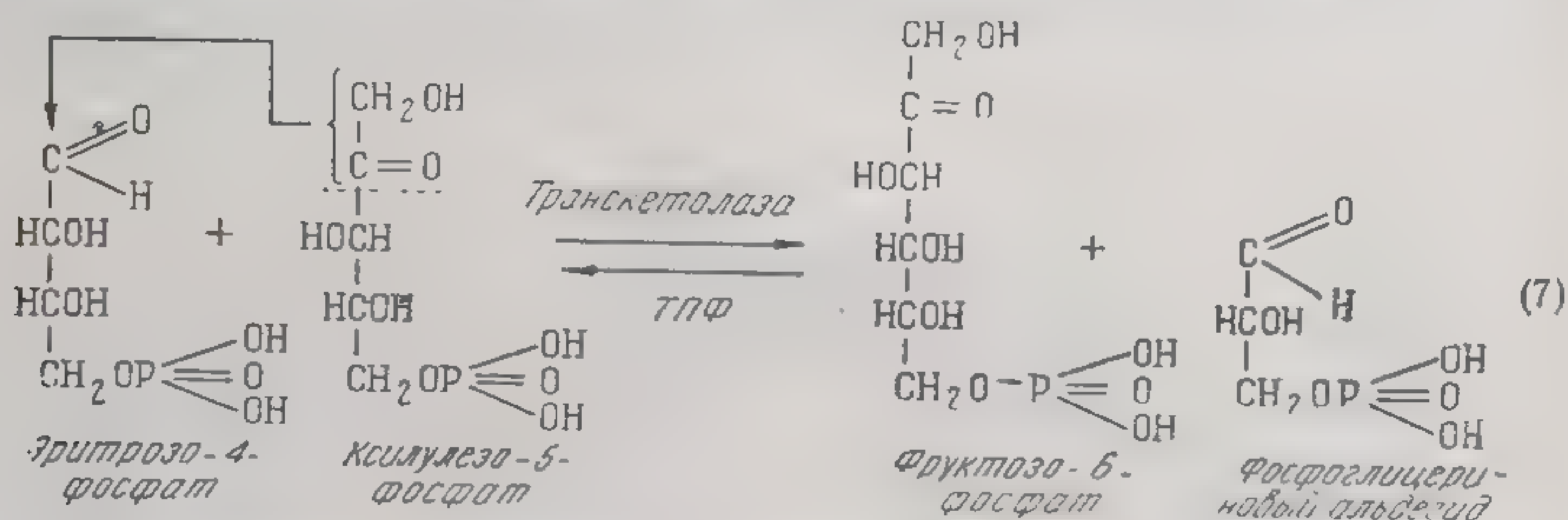
Переносчиком двууглеродного фрагмента является фермент транскетолаза, коферментом которого служит тиаминпирсфосфат, способный превращать двууглеродный компонент в активную транспортируемую форму. Транскетолаза, содержащаяся в дрожжах, получена в кристаллическом виде.

Е. Полученные соединения являются участниками дальнейших превращений, которые осуществляются в присутствии фермента — трансальдозы, способной переносить с одного вещества на другое фрагмент, состоящий из трех углеродных атомов. Так как донором этого фрагмента является седогептулеза, то остается соединение, содержащее четыре углеродных атома. По структуре своей оно является эритрозо-4-фосфатом. Вторым участником трансальдозной реакции, акцептирующим фрагмент из трех углеродных атомов, является фосфоглицериновый альдегид; следовательно, продуктом реакции будет фруктозо-6-фосфат.

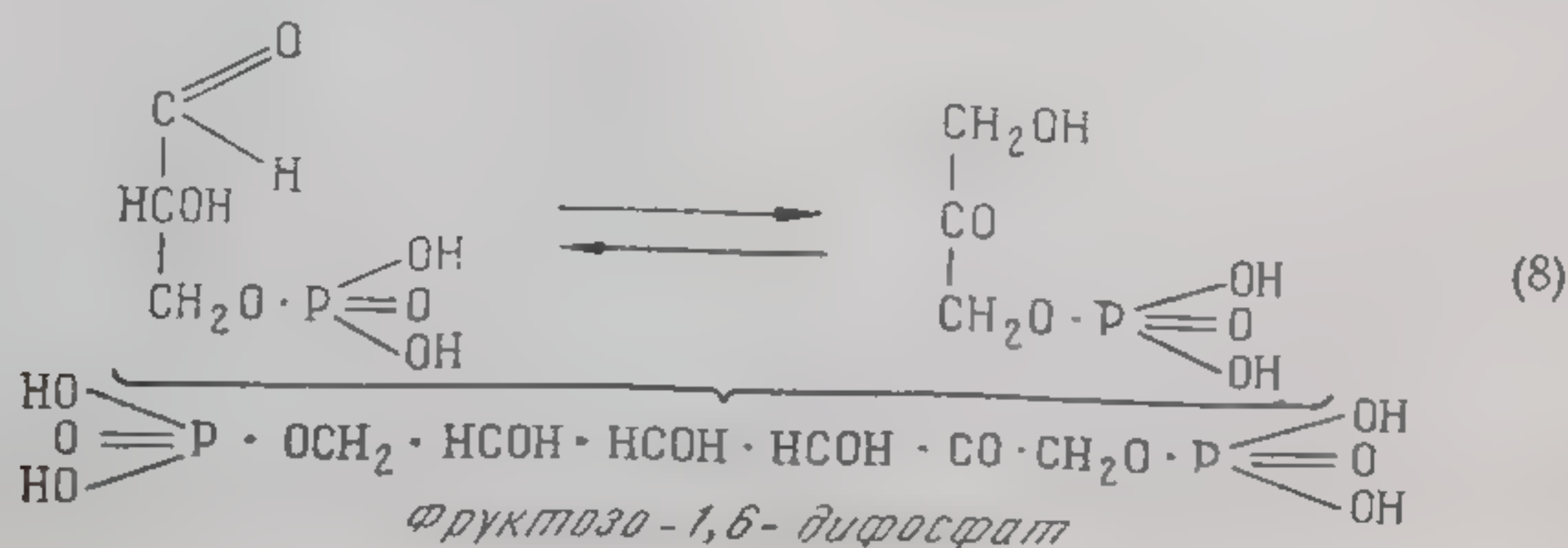


Эта реакция имеет очень большое значение, ибо показывает, каким образом благодаря двум ферментам — транскетолазе и трансальдолазе — обеспечивается взаимный переход гексозо- и пентозофосфатов. Очищенная трансальдолаза считается специфичной как в отношении донора трехуглеродного фрагмента, т. е. седогептулозофосфата, так и его акцептора — фосфоглицеринового альдегида.

Ж. Эритрозо-4-фосфат является участником транскетолазной реакции, второй раз включающейся в пентозный цикл. В данном случае, так же как и в первом, донором двууглеродного фрагмента будет пентозо-5-фосфат, акцептором же в отличие от ранее рассмотренной транскетолазной реакции — фосфоэритроза. Активность транскетолазной реакции обеспечивается выполняющим коферментную роль тиаминпирсфосфатом; образуется при этой реакции фруктозо-6-фосфат и фосфоглицериновый альдегид.

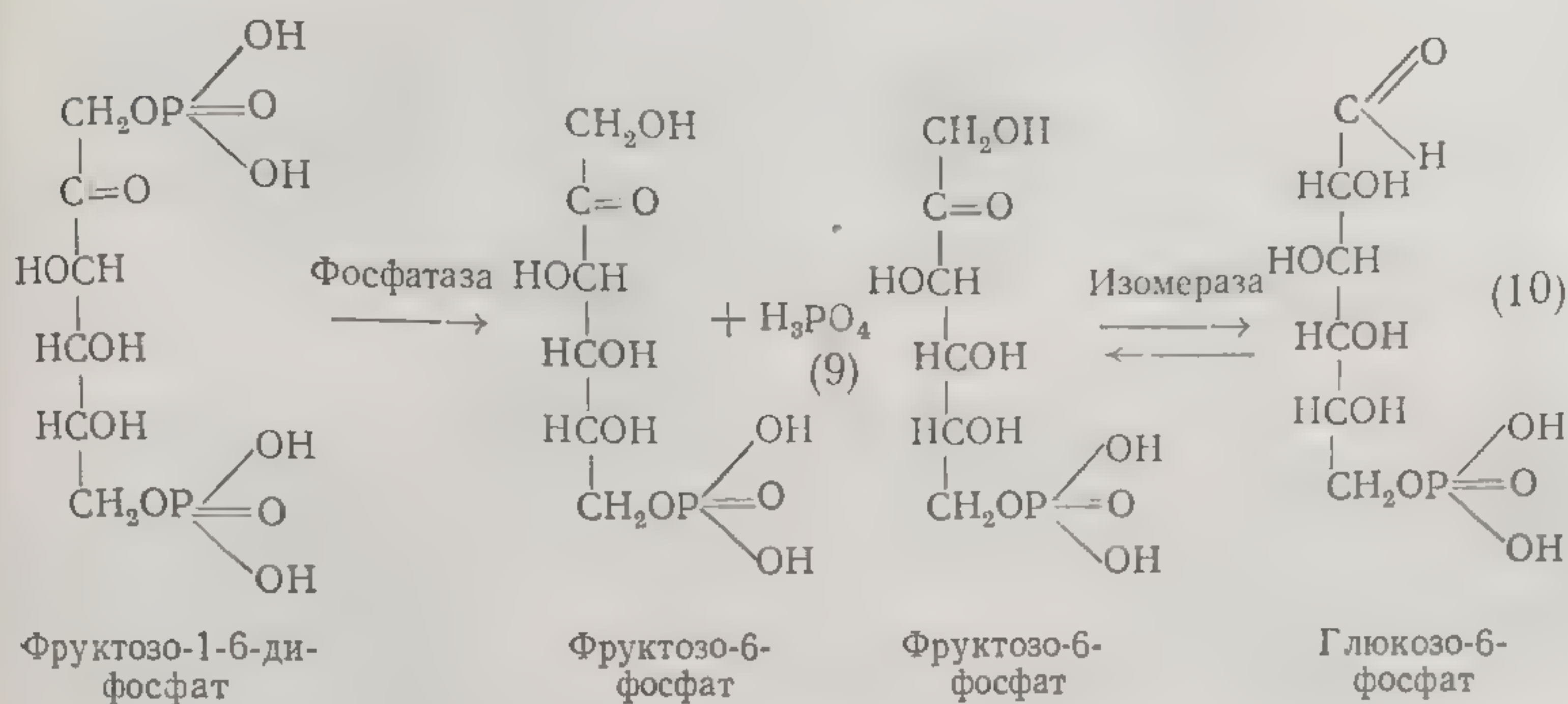


3. Дальнейшие превращения фосфоглицеринового альдегида могут идти различным путем. При разборе пентозного цикла следует оговорить, что в ряде ферментов, например в трансальдолазе, содержатся примеси значительного количества триозофосфатизомеразы, обеспечивающей образование фосфодиоксиацетона. При наличии альдолазы происходит конденсация двух фосфотриоз во фруктозодифосфат — реакция, хорошо изученная для процесса гликолиза.



Когда в биологическом материале находятся ферменты и кофакторы, которые обеспечивают гликолитическую оксидоредукцию, фосфоглицериновый альдегид может превращаться в фосфоглицериновую кислоту.

И. Фруктозодифосфат может быть одним из конечных продуктов, образующихся при пентозном цикле. Однако, как правило, в том биологическом материале, где протекает пентозный цикл, присутствуют фосфатазы, способные отщеплять фосфатный остаток, стоящий при первом углеродном атоме фруктозы в молекуле фруктозодифосфата. В этом случае наравне с минеральным фосфатом образуется еще одна молекула фруктозо-6-фосфата легко изомеризующаяся в исходное вещество, т. е. глюкозо-6-фосфат.



Суммируя совокупность разобранных реакций, удобно представить пентозный цикл в виде схемы, демонстрирующей, что из каждой шести молекул глюкозо-6-фосфата одна окисляется до CO_2 и H_2O , а пять регенерируются и выходят из цикла реакций в виде гексозо-6-фосфата. Согласно схеме, в образующихся при пентозном цикле фосфотриозах отсутствует углеродный атом, стоявший в глюкозо-6-фосфате на первом месте. Если первый углеродный атом глюкозы был помечен (например, C^{14}), то по содержанию углеродного атома в молочной кислоте нетрудно определить, произошла ли она путем гликолитического расщепления глюкозы или в результате дальнейших превращений фосфотриоз, образовавшихся путем пентозного цикла. При гликолитическом расщеплении первый углеродный атом глюкозы обязательно окажется в составе фосфотриоз и в образующихся из них пировиноградной и молочной кислотах. При образовании тех же соединений по пути пентозного цикла в них не может содержаться углеродный атом, стоявший в глюкозе на первом месте, так как при декарбоксилировании фосфоглюконовой кислоты он отщепился в виде CO_2 . Кроме того, карбоксильная группа пировиноградной или молочной кислот, образовавшихся путем гликолиза, будет содержать углеродный атом, стоявший в молекуле глюкозы как на третьем, так и на четвертом месте, причем приблизительно в равных количествах. Если же молочная кислота явилась продуктом превращения фосфотриоз, появившихся при пентозном цикле, то в карбоксильной группе окажется углерод, стоявший в молекуле глюкозы только на 4-м месте. Таким образом, при работе с глюкозой, содержащей радиоактивный углерод в различных положениях, можно по анализу радиоактивной метки в фосфотриозах, пировиноградной и молочной кислотах сделать заключение о пути образования этих соединений (см. схему прямого окисления углеводов стр. 180).

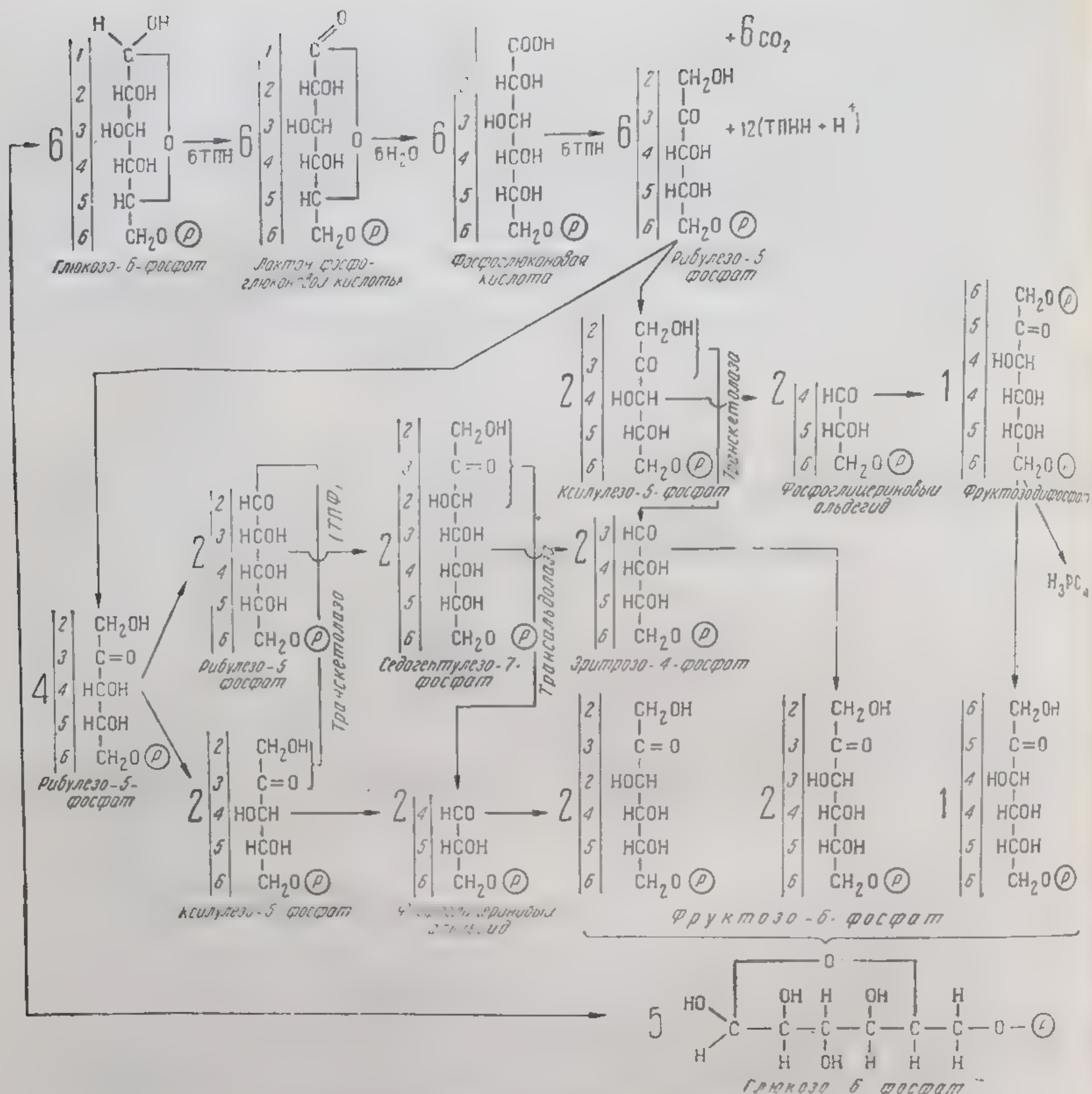
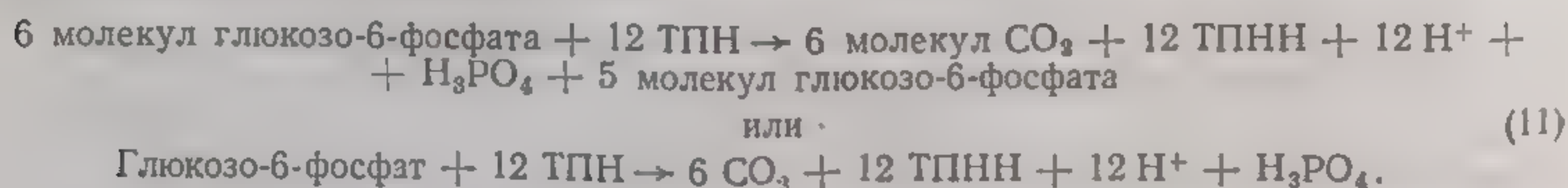


Схема прямого окисления углеводов (пентозный цикл).

Итоговое уравнение реакций, входящих в пентозный цикл, может быть представлено в следующем виде:



Следовательно, из шести молекул глюкозо-6-фосфата одна полностью окисляется с образованием 6 молекул CO₂; при этом 12 молекул трифосфопиридиннуклеотида переходят в восстановленную форму.

Прежде чем характеризовать значение пентозного цикла для животного организма, необходимо упомянуть о фотосинтетическом пути образования углеводов в растительных организмах и в микроорганизмах, осуществляющемся при участии ферментов пентозного цикла, ферментов, участвующих в процессе гликолиза, и нескольких дополнительно вовлекаемых ферментных активностей. К числу последних следует отнести прежде всего ферменты, участвующие в образовании фосфоглицериновой кислоты из рибулесто-5-фосфата: 1) рибулесто-фосфаткиназу и 2) карбоксилазу рибулестодифосфата.

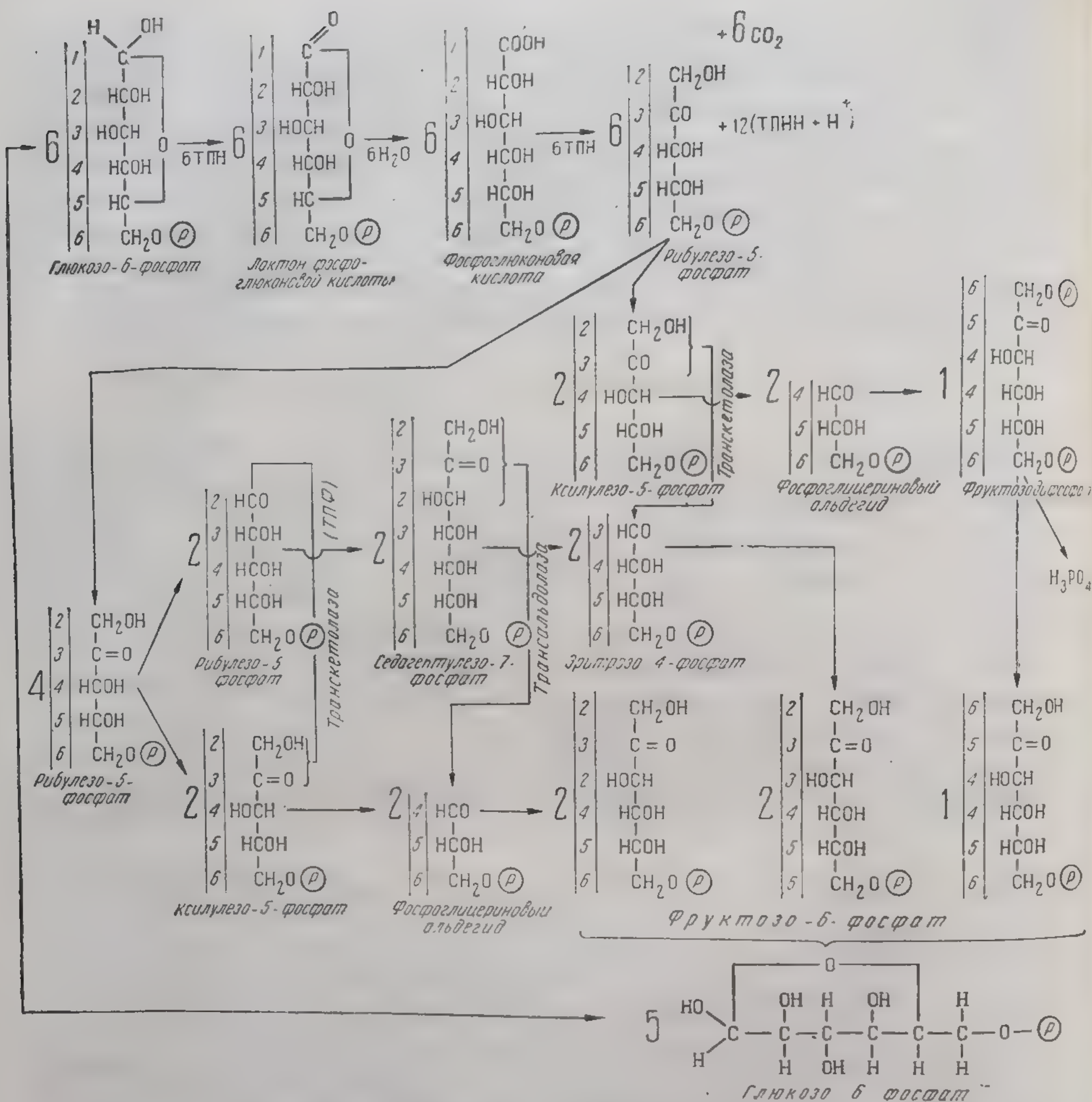
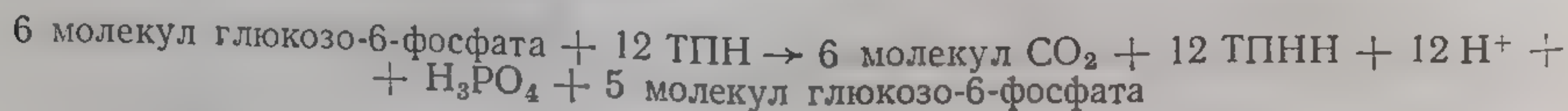


Схема прямого окисления углеводов (пентозный цикл).

Итоговое уравнение реакций, входящих в пентозный цикл, может быть представлено в следующем виде:



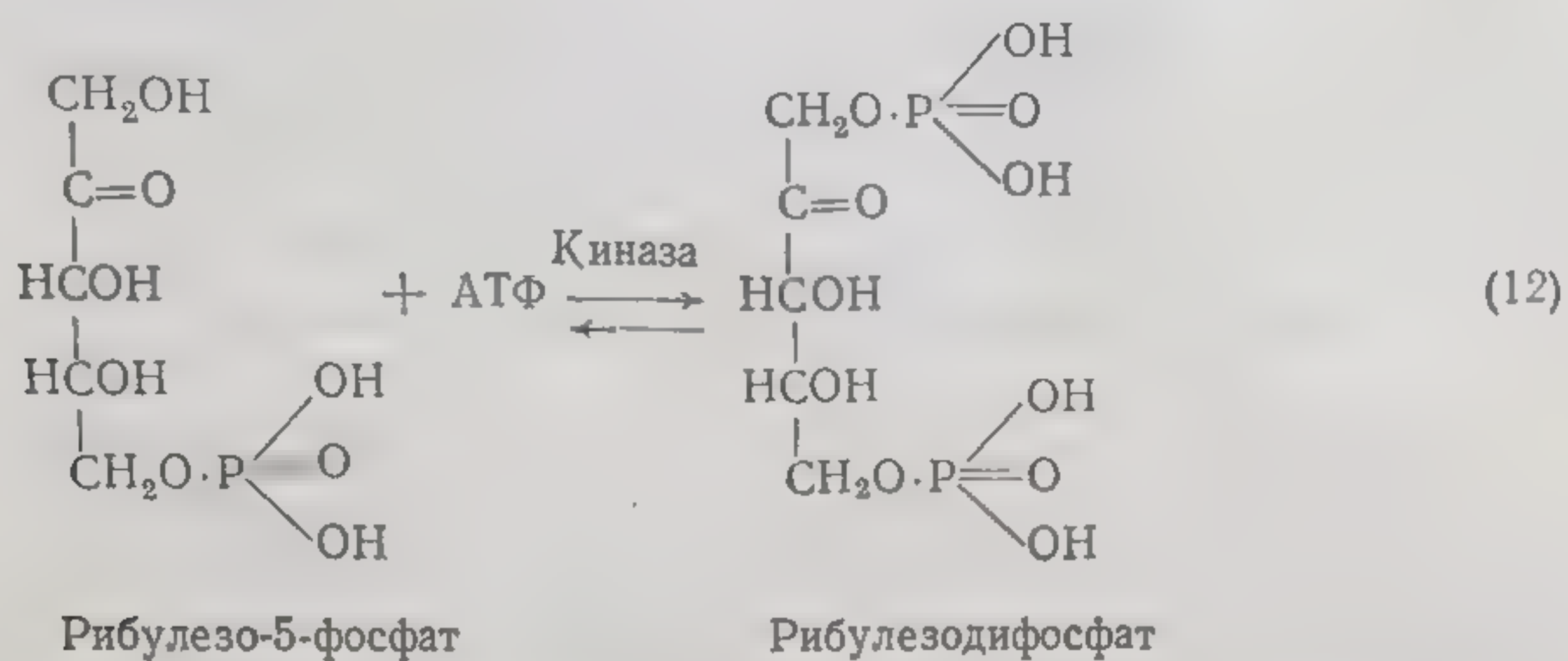
или



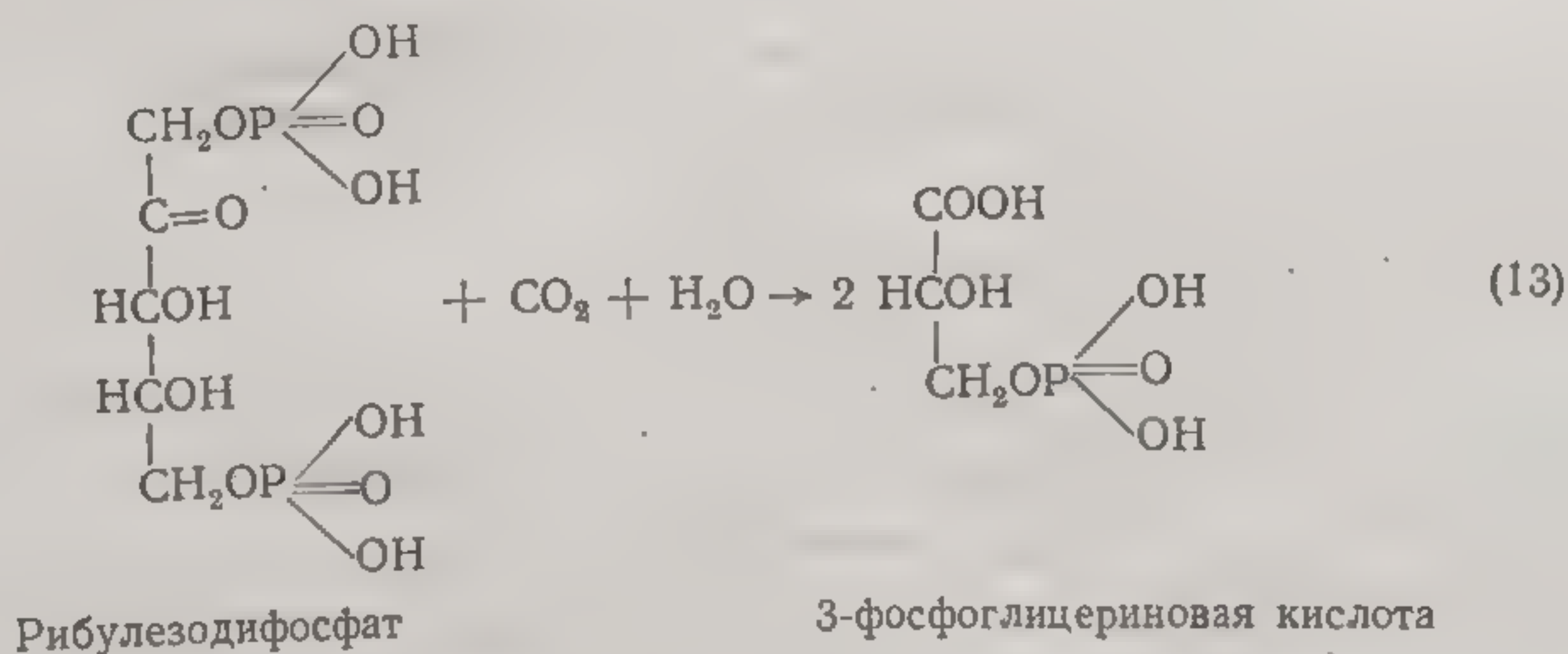
(11)

Следовательно, из шести молекул глюкозо-6-фосфата одна полностью окисляется с образованием 6 молекул CO₂ и 12 молекул ТПНН, а 5 молекул глюкозо-6-фосфата остаются.

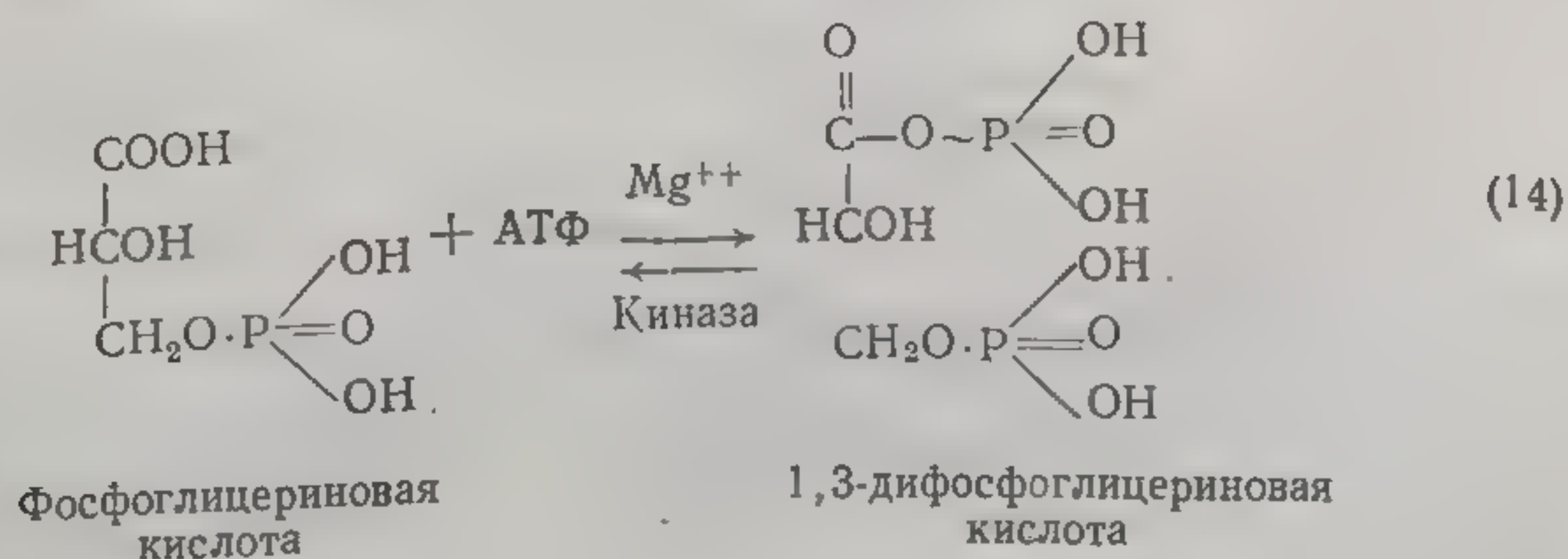
К. Объектом для исследования рибулезо-5-фосфаткиназы по преимуществу служили листья шпината, из которых фермент был получен в кристаллическом виде. Действие его специфично: акцептором фосфатной группы служит только рибулезо-5-фосфат, донором ее является только АТФ. Фермент содержит сульфгидрильную группу, обязательную для проявления активности, и требует присутствия ионов Mg^{++} . Равновесие реакции сильно сминуто в сторону дифосфата пентозы:



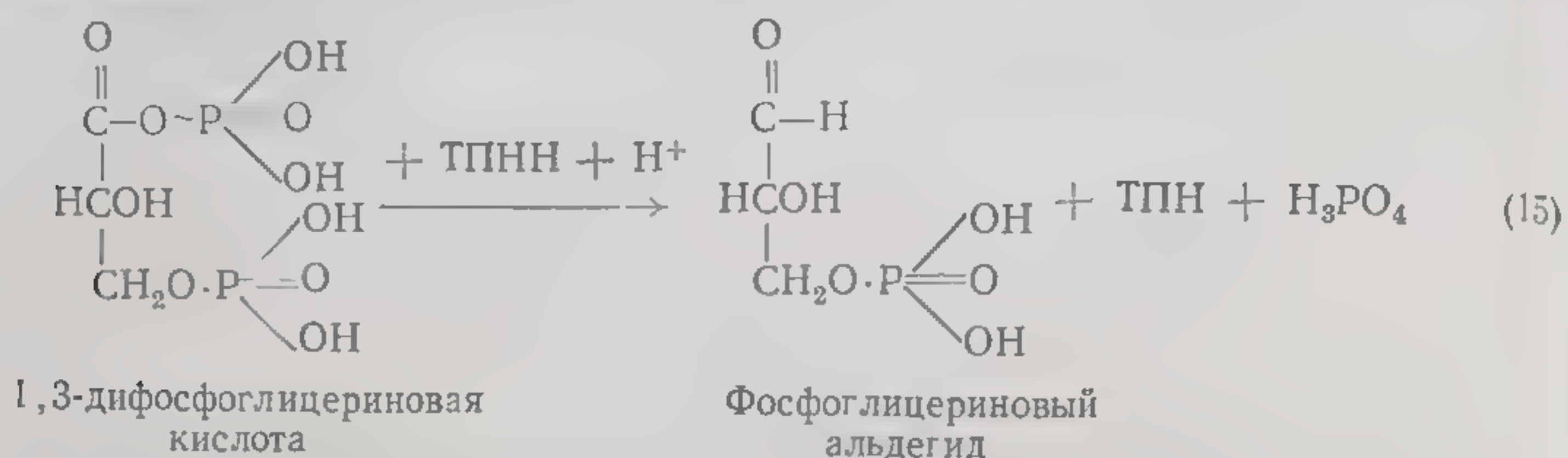
Л. Карбоксилаза рибулезодифосфата, иногда называемая также «карбоксидисмутаза», широко распространена в фотосинтезирующих организмах, находясь в хлоропластах и составляя так называемую «фракцию 1» — фракцию высокомолекулярного белка в экстракте из зеленых листьев, содержащем растворимые белки. Этот фермент катализирует процесс конденсации рибулезодифосфата с CO_2 , приводящий к образованию двух молекул фосfogлицириновой кислоты:



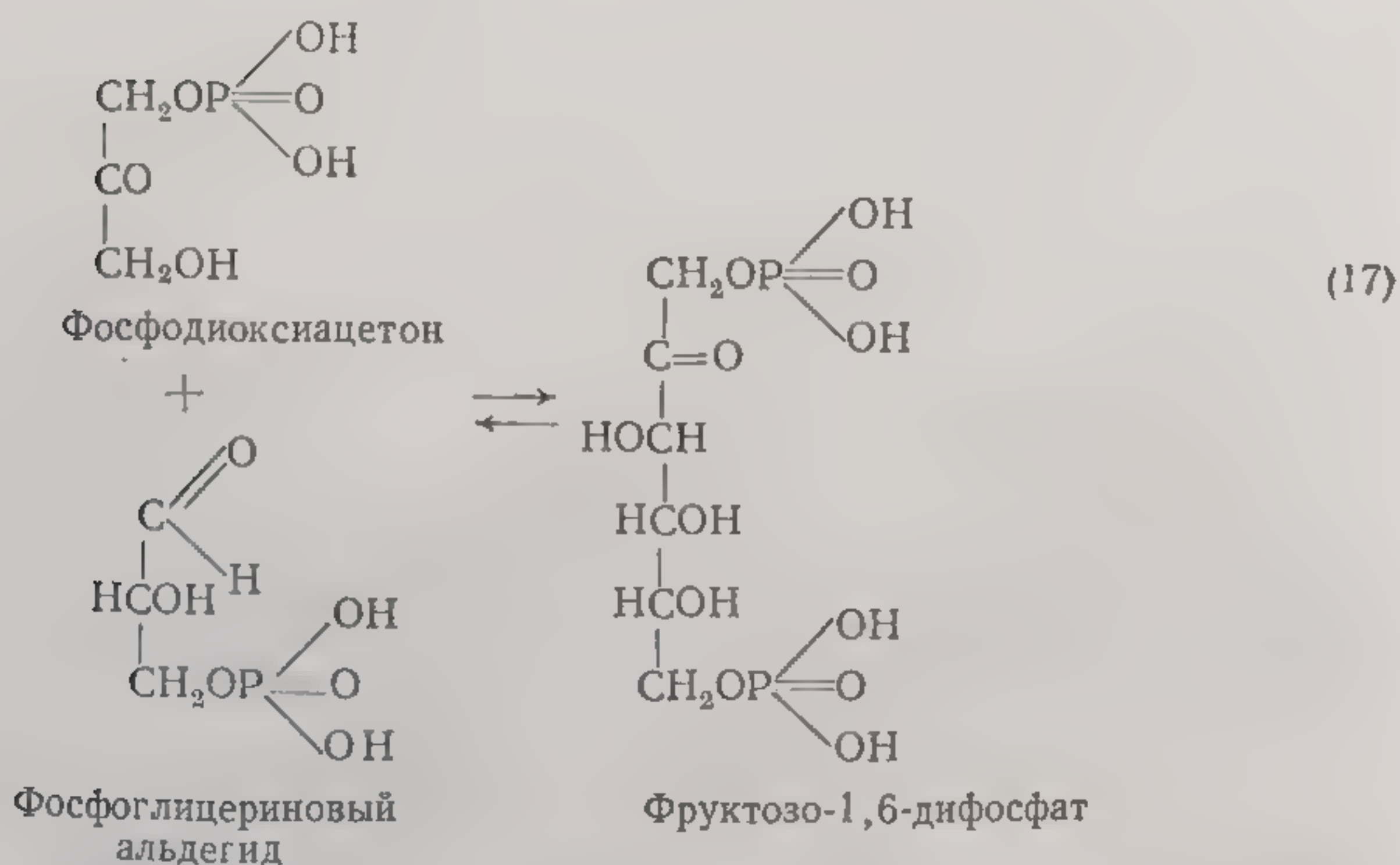
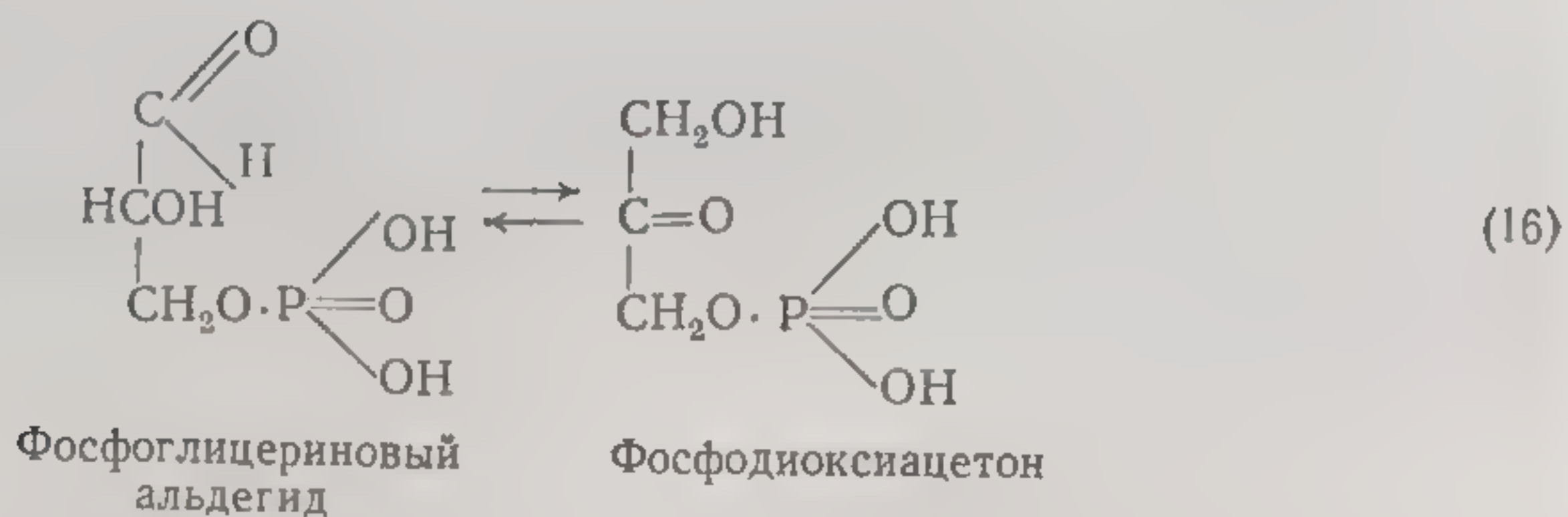
М. Дальнейший путь фотосинтетического образования гексоз представляет собой обращение реакции гликолитической оксидоредукции, приводящей к образованию сначала 1,3-дифосfogлицириновой кислоты, затем фосфотриоз, конденсирующихся во фруктозодифосфат:



Процесс восстановления 1,3-дифосфоглицериновой кислоты может протекать при участии дегидрогеназы, коферментом которой является ДПНН. Однако в фотосинтезирующих образованиях более широко представлена и, по-видимому, играет более значительную роль дегидрогеназа, коферментом которой является ТПНН:



Следующие этапы фотосинтетического образования гексоз также могут считаться выясненными. Прежде всего это альдолазная конденсация двух фосфотриоз с образованием фруктозодифосфата; данной реакции, конечно, предшествует изомеризация фосфоглицеринового альдегида с образованием фосфодиоксиацетона — необходимого компонента для образования фруктозодифосфата:



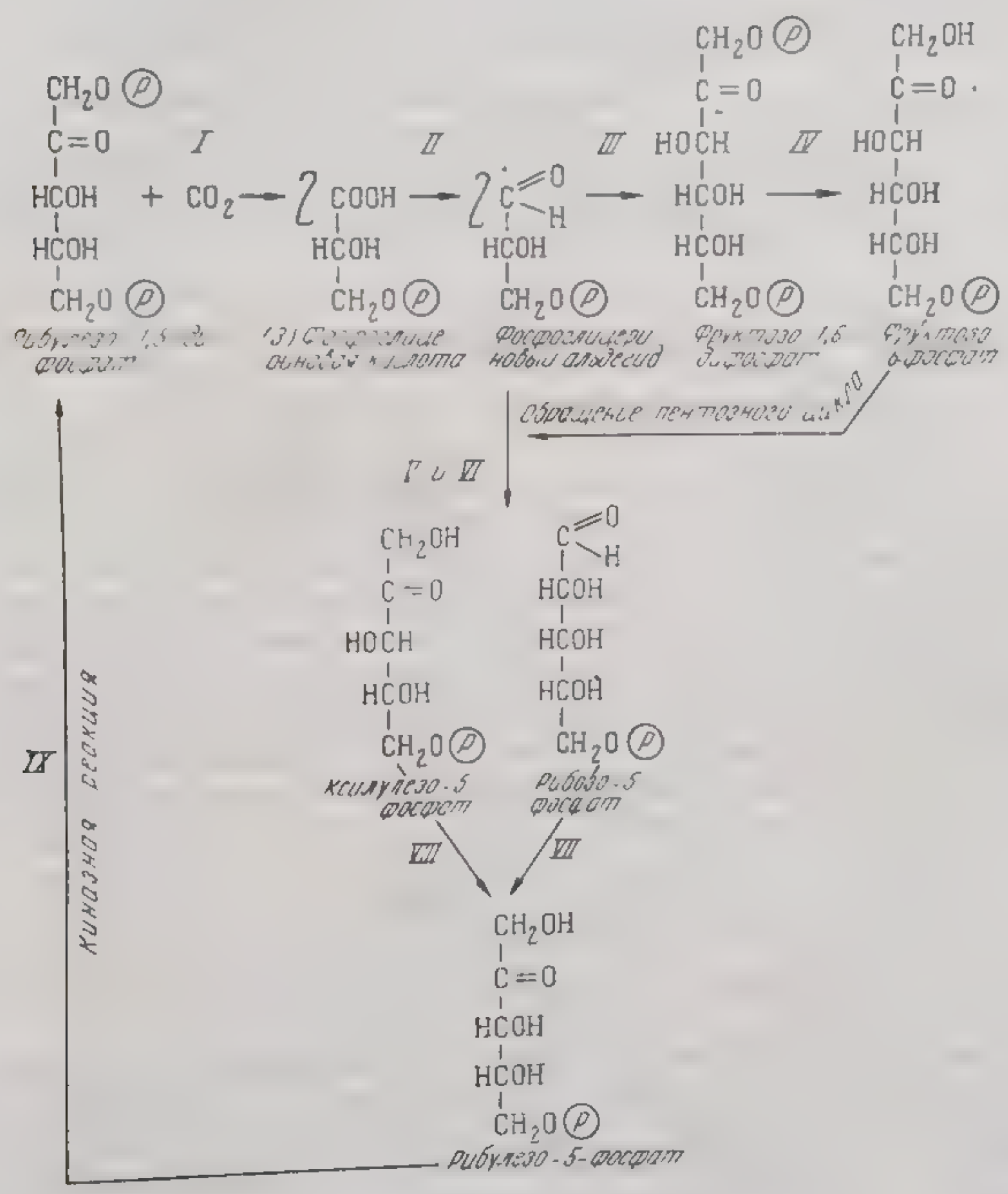
Дефосфорилирование фруктозодифосфата приводит к фруктозо-6-фосфату и освобождению минерального фосфата.

Образовавшийся фруктозо-6-фосфат участвует в реакциях, характерных для пентозного цикла, однако идущих в противоположном направлении.

Транскетолазная реакция обеспечивает образование из фруктозо-6-фосфата и фосфотриозы ксилулезо-5-фосфата и эритрозофосфата (обращен-

ная реакция 7, т. е. идущая справа налево). Трансальдозазная реакция вовлекает другую молекулу фруктозо-6-фосфата при участии эритрозо-4-фосфата в образование седогептулезо-7-фосфата и фосфоглицеринового альдегида (реакция 6 справа налево). Наконец, транскетолазная реакция, протекающая между седогептулезо-7-фосфатом и фосфоглицериновым альдегидом, приводит к образованию двух молекул пентозофосфатов: 1 молекулы рибозо-5-фосфата и одной молекулы ксилулезо-5-фосфата (обратное — справа налево — течение реакции 5).

Продолжая обратное течение реакций пентозного цикла, обе фосфопентозы — одна путем реакции эпимеризации (реакция 4 справа налево), а другая путем изомеризации (реакция 3 справа налево) — превращаются в рибулезо-5-фосфат. Теперь вступает реакция, характерная именно для фотосинтетического процесса, реакция образования рибулезодифосфата при участии специфической киназы (реакция 12), и последовательность реакций повторяется.



Схематически эти реакции могут быть изображены следующим образом: Последовательность реакций фотосинтеза и перечень участвующих в этом процессе ферментов могут быть представлены в виде схемы, помещенной на стр. 184.

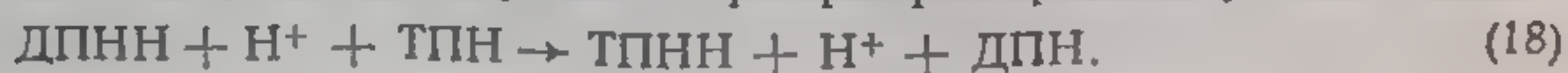
Последовательность реакций фотосинтеза

Реакции	Ферменты
3-пентозофосфат + 3-АТФ → 3-рибулезодифосфат + 3-АДФ	Фосфопентокиназа
3-рибулезодифосфат + 3CO ₂ + 3H ₂ O → 6-фосфоглицериновая кислота	Карбоксилаза рибулезодифосфата
6-фосфоглицериновая кислота + 6АТФ → 6-дифосфоглицериновая кислота + 6 АДФ	Киназа фосфоглицериновой кислоты
6-дифосфоглицериновая кислота + 6 ТПНН + Н ⁺ (6 ДПНН + Н ⁺) → 6-триозофосфат + 6 ТПН (6 ДПН) + 6 неорганический фосфат	Триозофосфат-дегидрогеназа
4-триозофосфат → 2-фруктозодифосфат	Триозофосфат-изомераза
2-фруктозодифосфат + 2H ₂ O → 2-фруктозо-6-фосфат + 2-неорганический фосфат	альдолаза Фосфатаза фруктозодифосфата
1-фруктозо-6-фосфат + 1-триозофосфат → 1-пентозофосфат + 1-эритрозофосфат	Транскетолаза
1-фруктозо-6-фосфат + 1-эритрозофосфат → 1-гептулезофосфат + 1-триозофосфат	Трансальдолаза
1-гептулезофосфат + 1-триозофосфат → 2-пентозофосфат	Транскетолаза
В итоге: 3CO ₂ + 9 АТФ + 5H ₂ O + 6ТПНН + Н ⁺ → 1-фосфотриоза + 9 АДФ + 6ТПН + 8-неорганический фосфат	

Из схемы вытекает, что молекулы пентозофосфата восстанавливаются в том же количестве, в каком они вступили в реакцию, другими словами, пентозофосфат выполняет в процессе фотосинтеза только каталитическую роль. Основным итог реакций, участвующих в процессе фотосинтеза, — это превращение трех молекул СО₂ в фосфотриозу. Энергия для фосфорилирования образующейся АДФ и превращения ее в АТФ, а также энергия для окисления ТПНН в ТПН должна поставляться при процессе фотосинтеза солнечными лучами. Если, таким образом, реакции пентозного цикла играют решающую роль в процессах фотосинтеза, то значение их в обмене веществ животного организма также весьма значительно. Пентозный цикл — путь прямого окисления глюкозо-6-фосфата, хотя в количественном отношении и занимает второстепенное место, по-видимому, является единственной возможностью для животного организма синтетически образовывать пентозы, входящие в состав различных соединений и в первую очередь нуклеиновых кислот.

Не менее важен тот факт, что восстановление ТПН с образованием ТПНН, играющим значительную роль в различных синтетических процессах, осуществляется в процессе пентозного цикла. Достаточно упомянуть о роли ТПНН в биосинтезе жирных кислот, в образовании гидрированных форм фолевой кислоты для участия в синтезе пуринов, в биосинтезе холестерина и т. д. Следует еще упомянуть о различных регулирующих функциях пентозного цикла: в синтезе кетостероидов, в углеводном обмене при диабете, при синтезе некоторых аминокислот и т. д.

В связи с образованием при пентозном цикле ТПНН важную роль играет реакция переноса водорода между ди- и три-фосфопиридиннуклеотидами:



Этой реакцией устанавливается тесная связь между пентозным циклом и процессами тканевого дыхания или биологического окисления, описанию которых посвящен следующий раздел.

3. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

С. Е. Северин

Процессы жизнедеятельности, протекающие в организме, связаны с постоянным разрушением составных частей живого и непрерывным их созданием. Совокупность процессов усвоения (ассимиляции) и создания, разрушения (диссимиляции) и выведения составляет сущность обмена веществ — неотъемлемого признака всего живого. Обмен веществ неразрывно связан с обменом энергии. В высокоорганизованном животном организме приток энергии обеспечивается поступающими в организм продуктами питания — в первую очередь белками, углеводами и жирами.

Однако перечисленные соединения, как входящие в состав продуктов питания, так и являющиеся составными частями органов и тканей организма, не могут служить субстратами биологического окисления; они предварительно подвергаются расщеплению. Белки под влиянием ферментов пищеварительного тракта или тканевых протеаз распадаются на аминокислоты; нейтральные жиры под влиянием липаз — на глицерин и жирные кислоты; а сложные углеводы превращаются в простые — моносахариды, из которых наибольшее значение имеют гексозы. Аминокислоты, жирные кислоты и глицерин, моносахариды, а также другие вещества, образовавшиеся из более сложных соединений в пищеварительном тракте, подвергаются всасыванию, т. е. поступают в кровь — либо непосредственно, либо пройдя через лимфатическую систему. В кровь поступают также соединения, образовавшиеся в органах и тканях. Смешавшись с веществами, поступившими из пищеварительного тракта, они образуют так называемый метаболический фонд, из которого организм черпает соединения, необходимые ему как для осуществления биосинтезов, так и для обеспечения энергией процессов жизнедеятельности. Центральную роль при этом играют органические кислоты, входящие в так называемый лимоннокислый цикл. Это

Лимонная кислота $\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \underset{\text{COOH}}{\underset{|}{\text{C}}} \cdot (\text{OH}) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$

Кетоглутаровая кислота $\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH}$

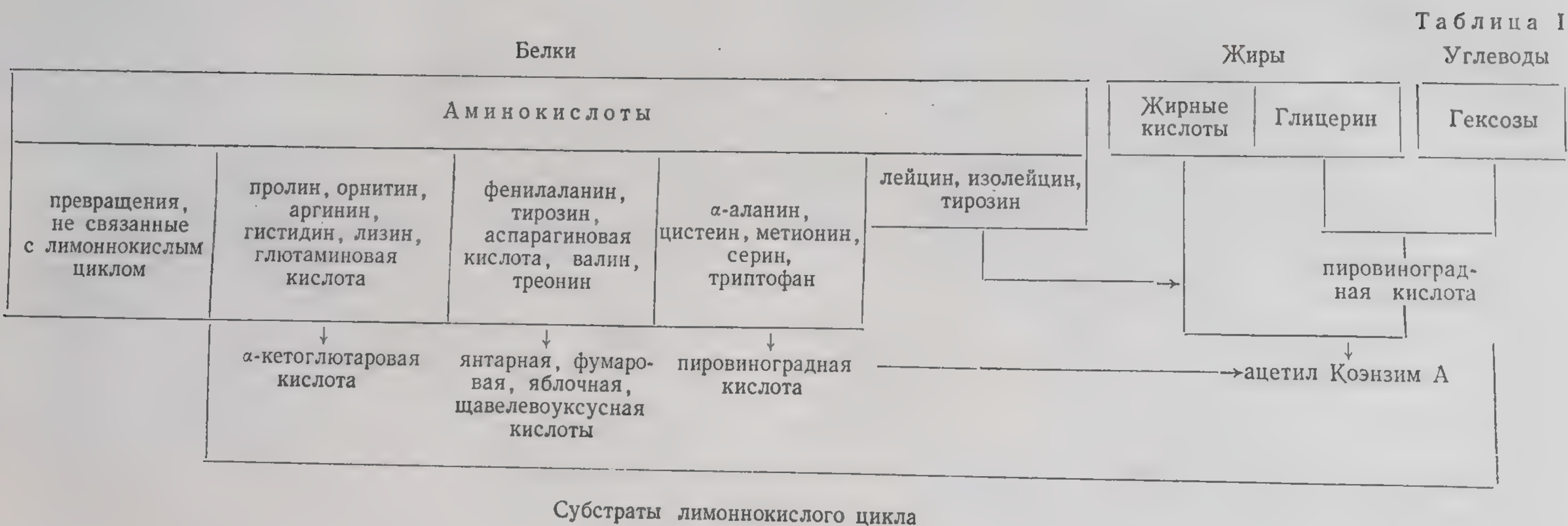
Янтарная кислота $\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$

Фумаровая кислота $\text{HOOC} \cdot \text{CH}=\text{CH} \cdot \text{COOH}$

Яблочная кислота $\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CHOH} \cdot \text{COOH}$

Щавелевоуксусная кислота $\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH}$

Здесь же следует упомянуть о пировиноградной кислоте $\text{CH}_3\text{—CO—COOH}$, которая хотя и не входит в лимоннокислый цикл, но играет в нем весьма существенную роль. Пировиноградная кислота является предшественником активной ацетильной группы, участвующей вместе со щавелевоуксусной кислотой в образовании лимонной кислоты.



Прежде чем описывать окисление перечисленных соединений в лимоннокислом цикле, необходимо рассмотреть те своеобразные превращения, которые претерпевают продукты распада белков, жиров и углеводов. Эти превращения приводят к образованию субстратов лимоннокислого цикла и являются как бы предварительными для процессов биологического окисления.

Большая часть аминокислот превращается в субстраты лимоннокислого цикла. Источниками пировиноградной кислоты являются α -аланин, серин, цистеин, метионин, триптофан. Фенил-аланин и тирозин через сложный путь превращений образуют фумаровую кислоту, а также ацетуксусную кислоту, следовательно, и ацетил-КоА; лейцин и изолейцин являются источниками образования ацетил-КоА, валин — янтарной кислоты, пролин, орнитин, аргинин, гистидин — кетоглутаровой кислоты, аспарагиновая и глутаминовая кислоты путем переаминирования особенно легко переходят в соответствующие кетокислоты. Таким образом, аминокислоты, если не все, то очень многие, при процессах тканевого обмена образуют субстраты лимоннокислого цикла. То же можно сказать и о жирных кислотах, так как их окисление через ряд промежуточных соединений приводит к образованию ацетил-КоА, а глицерин через глицерофосфат превращается в фосфотриозы. Углеводы в результате гликолиза всегда, а через пентозный цикл частично являются источниками способных переходить друг в друга пировиноградной и молочной кислот. О пировиноградной кислоте как о важном участнике лимоннокислого цикла уже говорилось выше.

Таким образом, вслед за гидролитическим расщеплением белков, жиров и углеводов из продуктов реакции, при дальнейших их превращениях, образуется небольшое число одинаковых по структуре соединений, окисляющихся в цикле трикарбоновых кислот. Описанные соотношения схематически представлены в табл. 1 стр. 186.

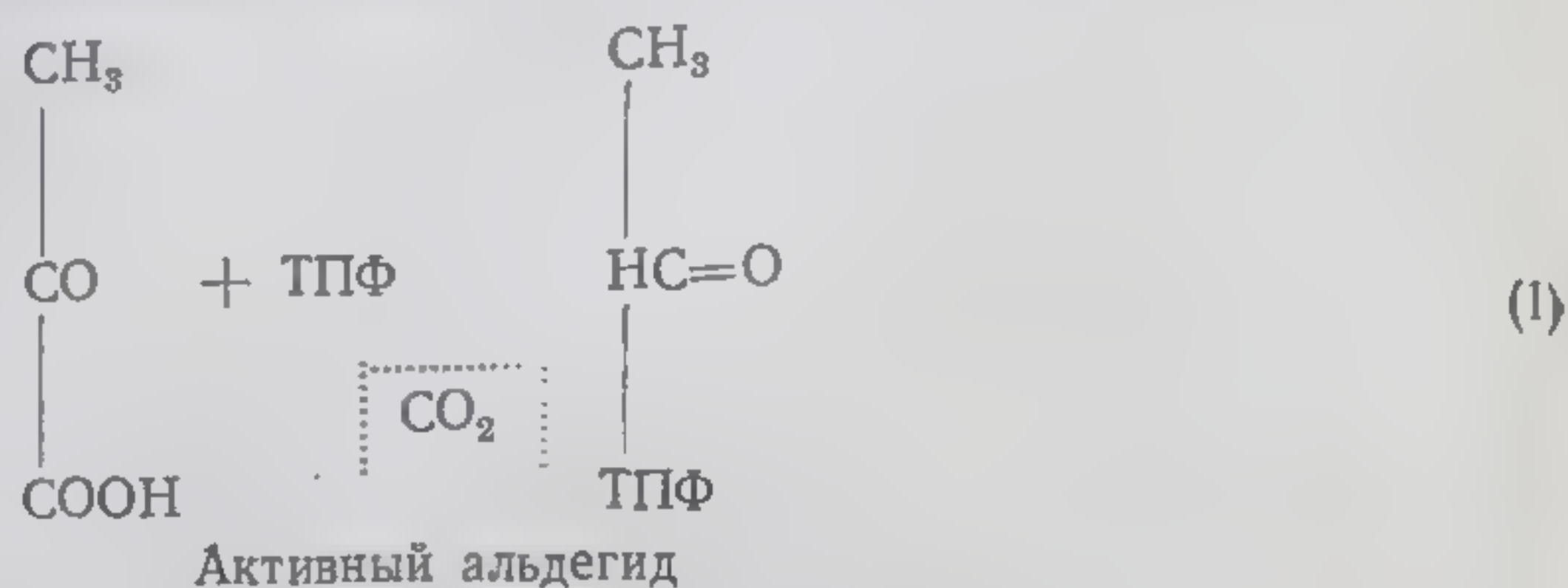
ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Окислительные процессы, получившие наименование «лимоннокислого цикла», или цикла трикарбоновых кислот, или цикла Кребса, сосредоточены в митохондриях. Митохондрии представляют собой структурные частицы протоплазмы, имеющие вытянутую форму, достигающие в длину 7 μ , а в ширину 0,2—2 μ . Митохондрии обладают оболочкой, состоящей из двух слоев. Внутренний слой заходит в глубину митохондрий, образуя гребни и создавая в них определенную структуру. В этих гребнях, а также в пространстве между ними сосредоточены многие ферменты, в частности все ферменты лимоннокислого цикла, объединяемые в одну общую циклофоразную систему.

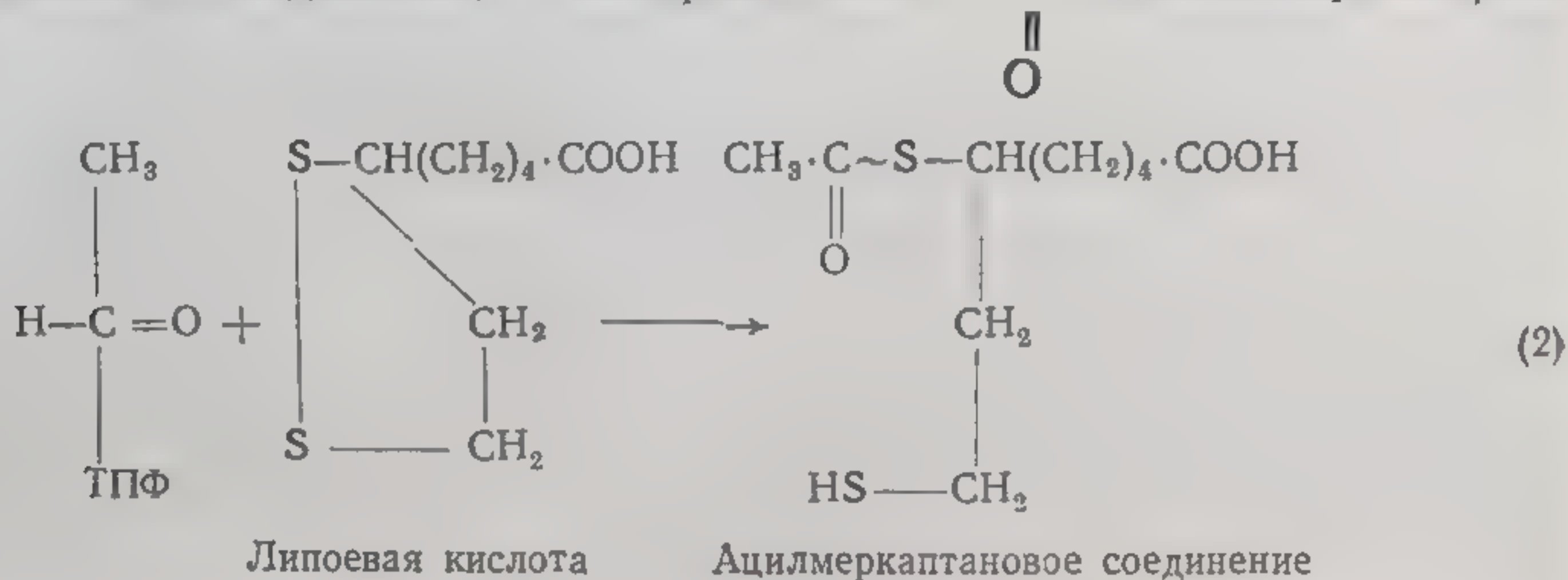
Рассмотрение процессов окисления, протекающих в митохондриях, удобно начать с пировиноградной кислоты.

А. Окисление пировиноградной кислоты осуществляется при участии фермента весьма сложной структуры. Выделенная из грудных мышц голубя дегидрогеназа пировиноградной кислоты после очистки оказалась, судя по данным электрофоретического и седиментационного анализа, гомогенным белком. Его структура весьма сложна, молекулярный вес очень значителен и составляет около 4 000 000. К коферментам, участвующим вместе с дегидрогеназой в превращениях пировиноградной кислоты, принадлежат ТПФ, липоевая кислота, кофермент А, ДПН. Необходимо также участие ионов Mg^{++} . В итоге реакции образуется свободная CO_2 и ацетил-КоА. Последовательность реакций, по-видимому, можно представить следующим образом:

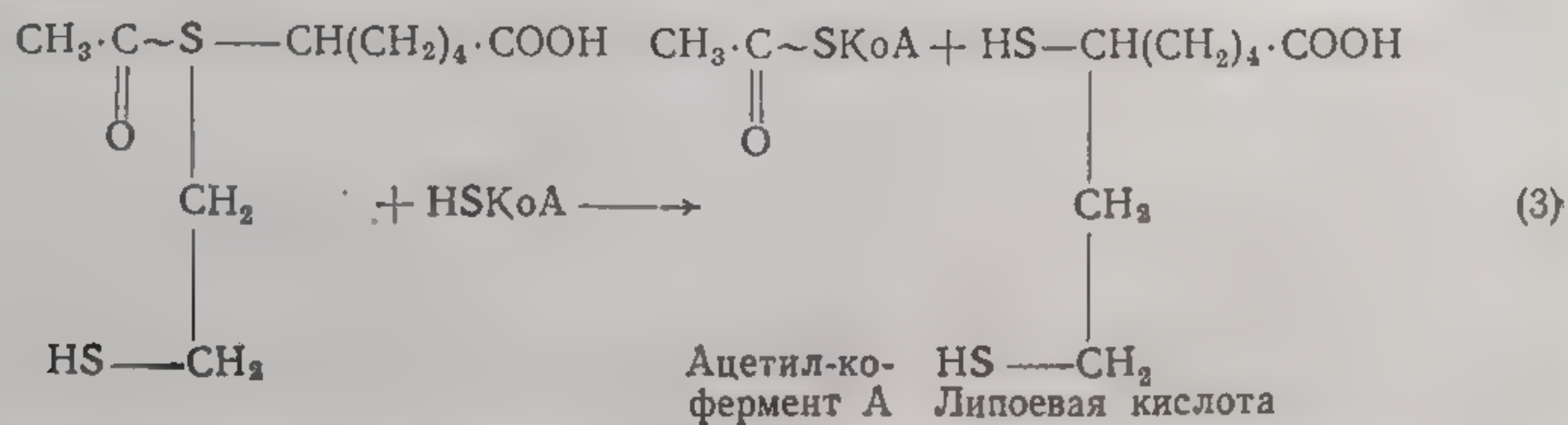
Вначале под влиянием дегидрогеназы и ТПФ освобождается CO_2 ; при этом образуется активный альдегид, фиксированный на ТПФ.



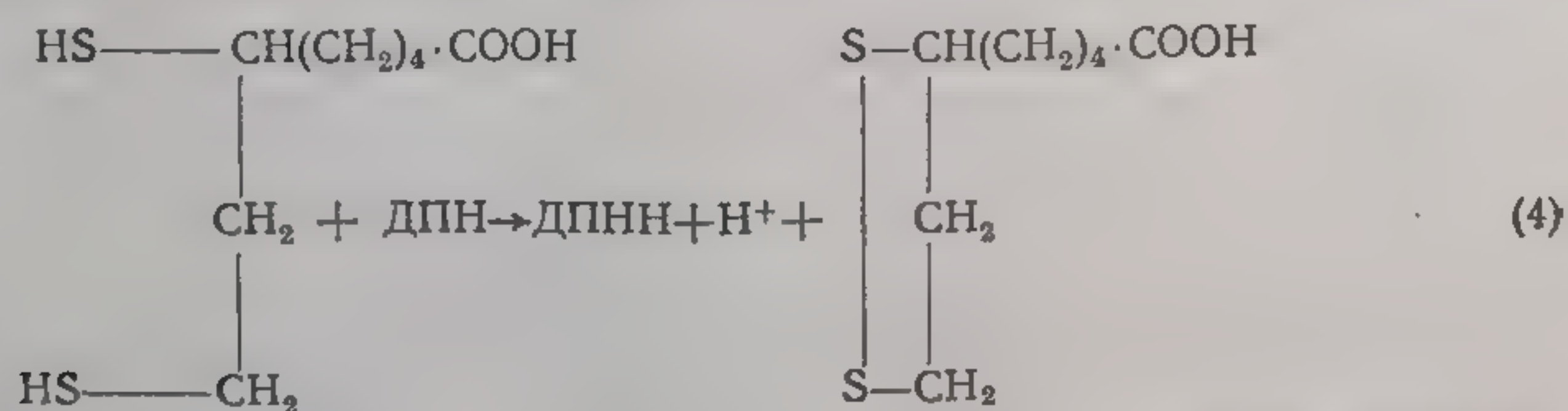
Дальнейшие реакции удалось расчленить при исследовании микроорганизмов. В какой мере установленные данные действительны и для дегидрогеназы, содержащейся в животных тканях, неизвестно. Однако нельзя исключить, что и в этом случае следующей реакцией является взаимодействие «активного альдегида» с липоевой кислотой и образование ацилмеркаптанового соединения, в котором связь $-\text{C}\sim\text{S}$ высокоэнергетическая.



Далее осуществляется перенос ацильного остатка, соединенного с липоевой кислотой, на КоА и образование ацетил-КоА. При этом липоевая кислота освобождается в виде восстановленного, содержащего две HS-группы соединения:

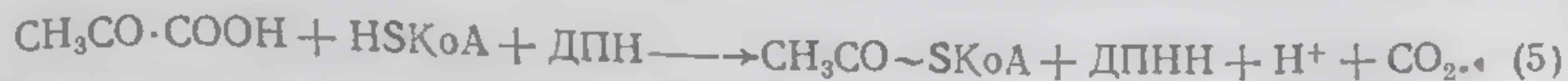


На следующей стадии происходит взаимодействие восстановленной формы липоевой кислоты с ДПН:

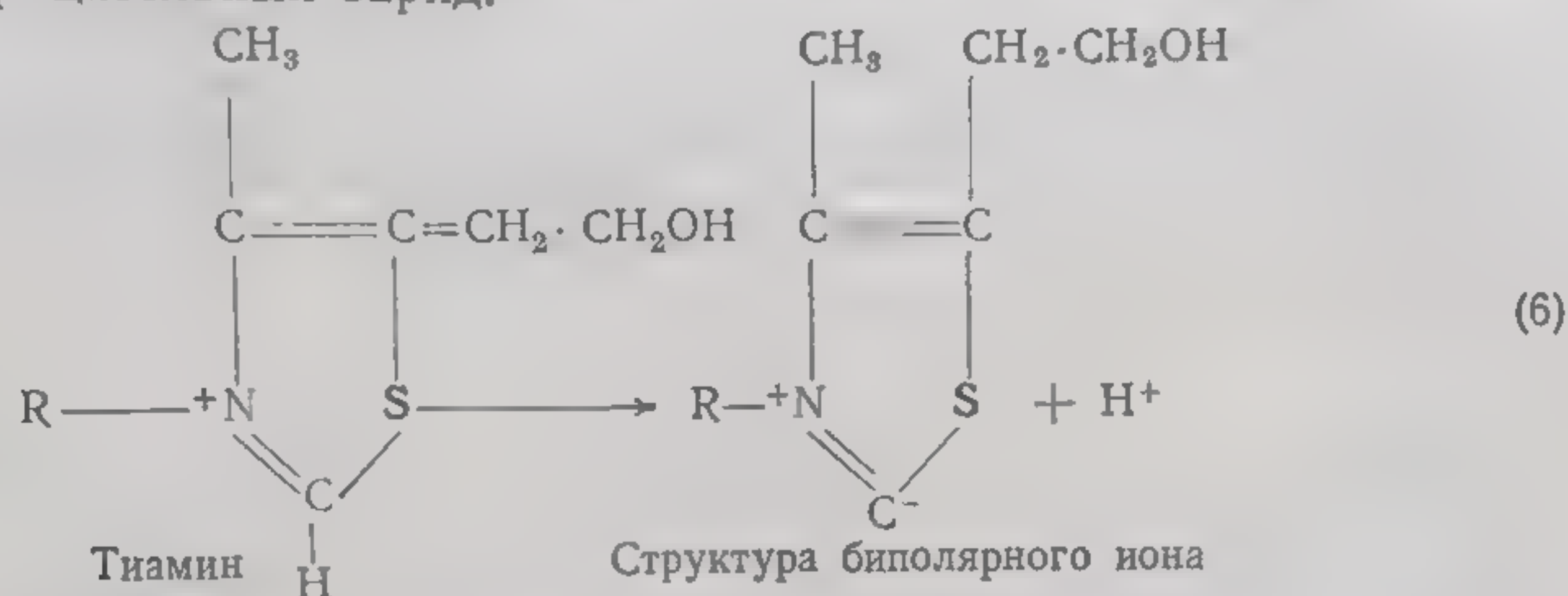


В итоге всех реакций произошло окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, сопровождавшееся восстановлением дифосфо-

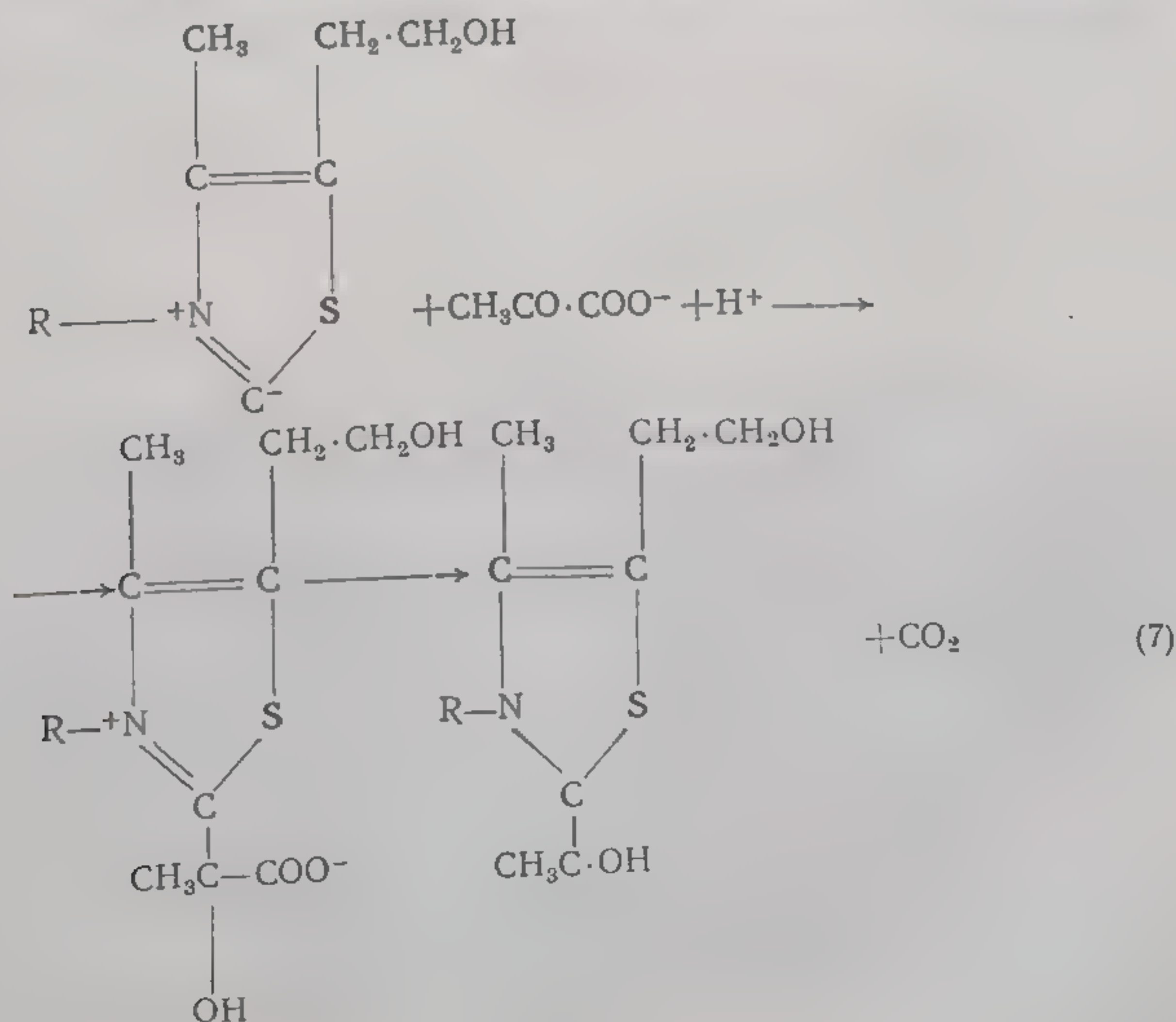
пиридиннуклеотида и фиксацией ацетильного остатка на коферменте А. ТПФ и липоевая кислота выходят из реакции в том же виде, в каком вступали в нее:

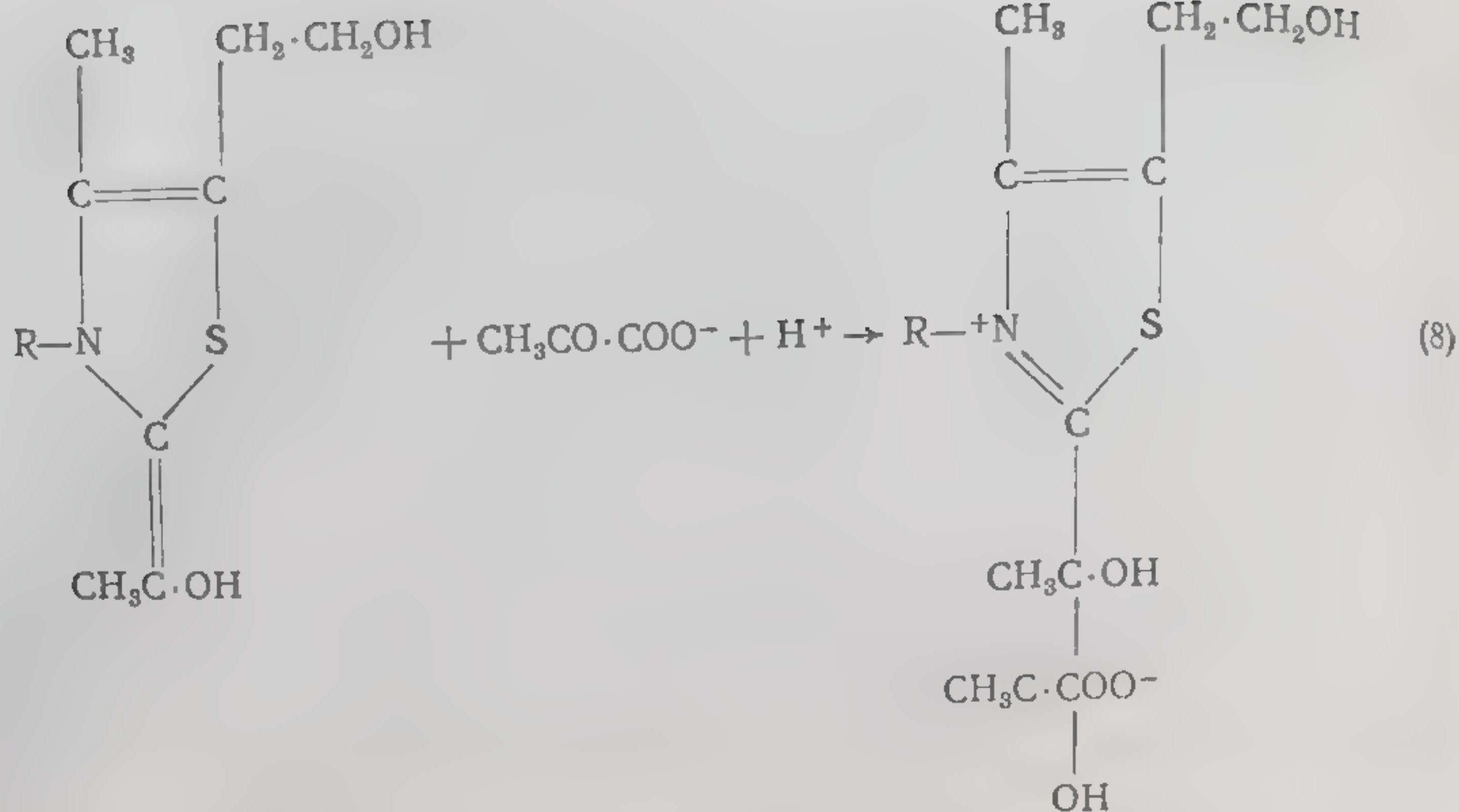


Следует подчеркнуть, что превращения, произошедшие с пировиноградной кислотой, представляют собой первое дегидрирование и первое декарбоксилирование в лимоннокислом цикле, причем водород акцептировался на ДПН, приводя к образованию ДПНН + H⁺. Химические реакции, лежащие в основе процесса декарбоксилирования пировиноградной кислоты, до сих пор остаются неясными. Предположения, высказанные по этому поводу Breslow и Mizahara, на основании результатов модельных опытов можно считать наиболее обоснованными. Согласно указанным авторам, последовательность реакций тиамина с пировиноградной кислотой может быть представлена в следующем виде: водород, стоящий при втором углеродном атоме тиазолового кольца, легко ионизирует, причем на углероде возникает отрицательный заряд:

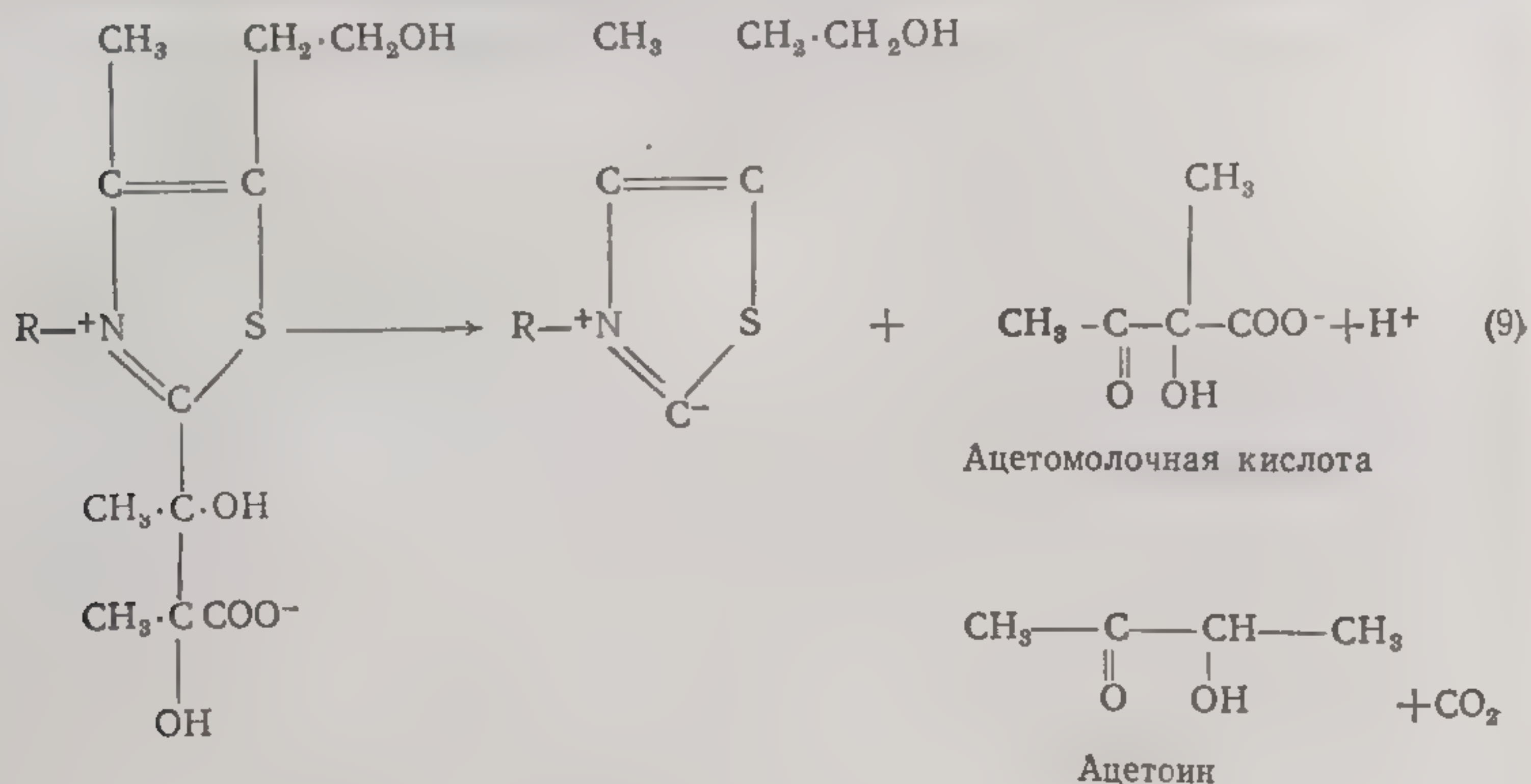


Отрицательно заряженный атом С является местом фиксации пировиноградной кислоты, причем образовавшийся продукт конденсации легко теряет CO₂ и вступает в реакцию еще с одной молекулой пировиноградной кислоты.





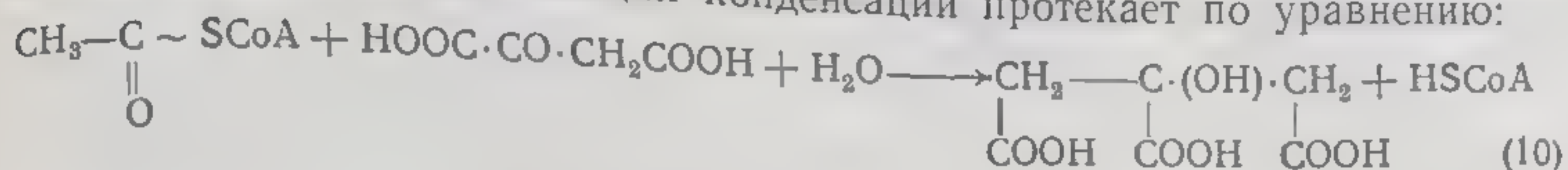
От образовавшегося соединения отщепляется ацетомолочная кислота. Это вещество декарбоксилируется с освобождением CO_2 и ацетона.



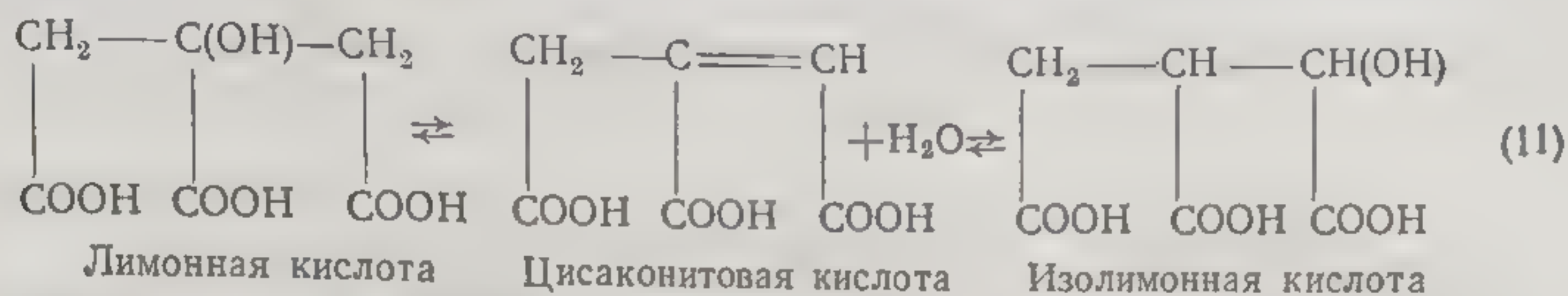
Новым в изложенной гипотезе является указание на легкую ионизацию водорода, стоящего в тиазольном кольце при углеродном атоме на втором месте и на роль последнего, а не стоящих в кольце N или S в реакции декарбоксилирования α -кетокислот. Веским аргументом в пользу изложенного механизма действия тиамина является полное отсутствие витаминной активности у производного B_1 , метилированного при втором углеродном атоме в тиазольном кольце.

Б. Следующей реакцией после окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты является конденсация ацетил-КоА со щавелевоуксусной кислотой, приводящая к образованию лимонной кислоты. Эта реакция катализируется конденсирующим ферментом, широко распространенным в животных тканях, характеризующихся интенсивным окислительным обменом. Конденсирующий фермент был получен из сердца свиньи в кристаллическом виде; после четырехкратной кристаллизации он оказался гомогенным белком (при электрофорезе и ультрацентрифугировании),

не содержащим примеси других ферментов, за исключением дегидрогеназы изолимонной кислоты. Реакция конденсации протекает по уравнению:

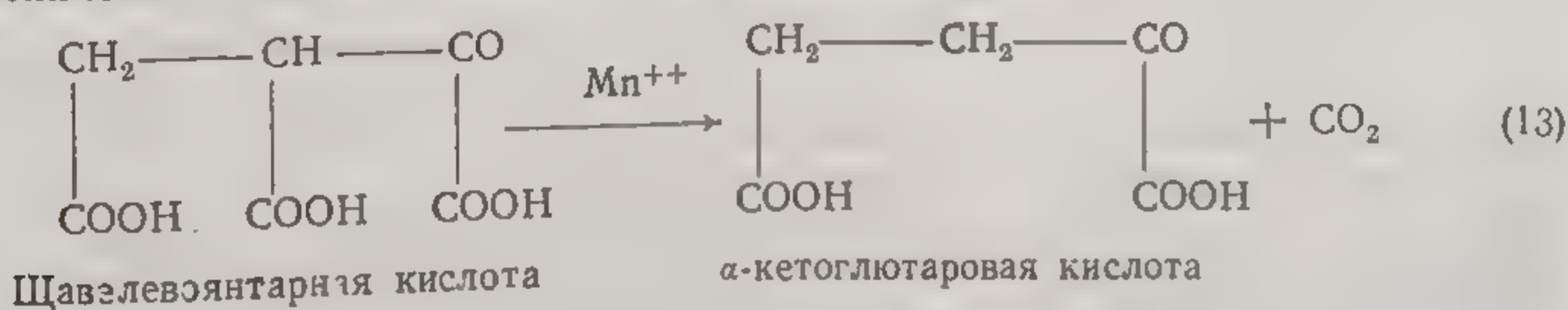
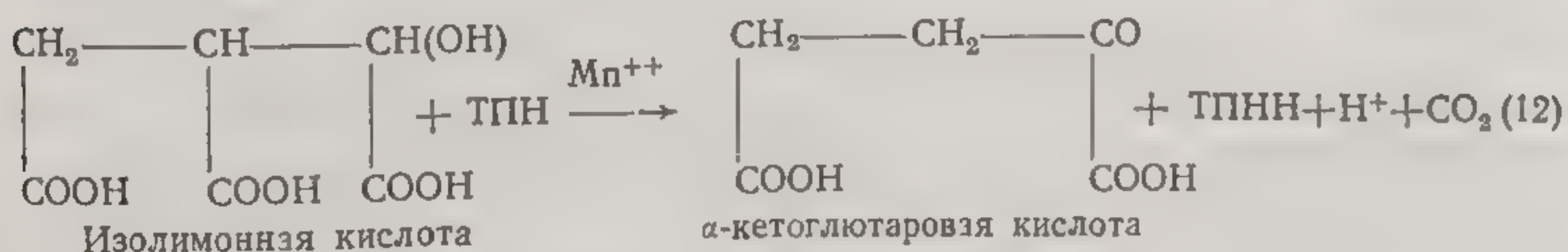


В. Лимонная кислота не является субстратом дальнейших окислительных реакций, протекающих в лимоннокислом цикле. Таким веществом служит изолимонная кислота, которая образуется из лимонной через цисаконитовую кислоту.

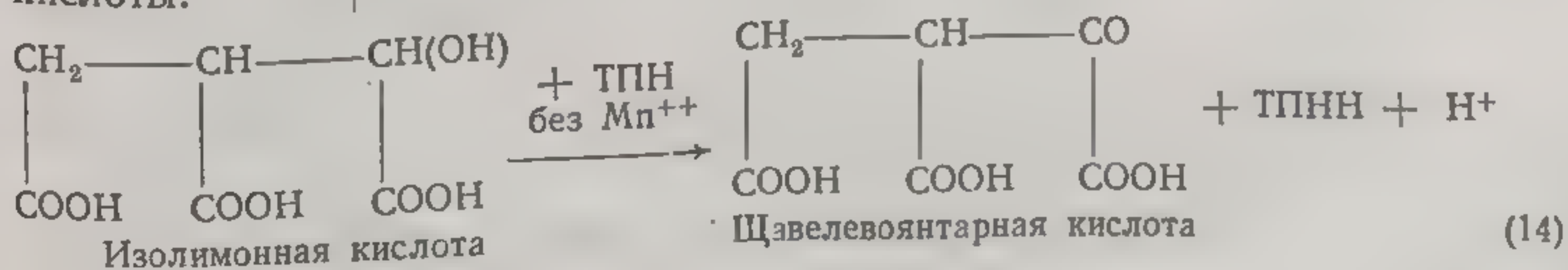


Процесс этот катализируется ферментом аконитазой, выделенной из сердца свиньи. Равновесие между тремя веществами — лимонной, цисаконитовой и изолимонной кислотами — в присутствии аконитазы при pH между 6,8—7,4 устанавливается при концентрациях 89,5 : 4,3 : 6,2. Ферментативная активность аконитазы резко подавляется цианидами, сульфидами и трансизомером аконитовой кислоты.

Г. Окисление изолимонной кислоты в цикле осуществляется при участии дегидрогеназы, коферментом которой является ТПН. Процесс имеет, по-видимому, две стадии: сначала образуется щавелевоянтарная кислота, а затем она декарбоксилируется с образованием кетоглутаровой кислоты. Продуктом реакции при действии дегидрогеназы на изолимонную кислоту является кетоглутаровая кислота. Тот же фермент в присутствии щавелевоянтарной кислоты способен вызвать образование и из нее кетоглутаровой кислоты. Обе реакции требуют присутствия Mn^{++} .



Приводятся также данные относительно возможного одноступенчатого превращения изолимонной кислоты дегидрогеназой, не требующей участия Mn^{++} . В этом случае продуктом реакции будет щавелевоянтарная кислота, и фермент можно было бы считать истинной дегидрогеназой изолимонной кислоты.



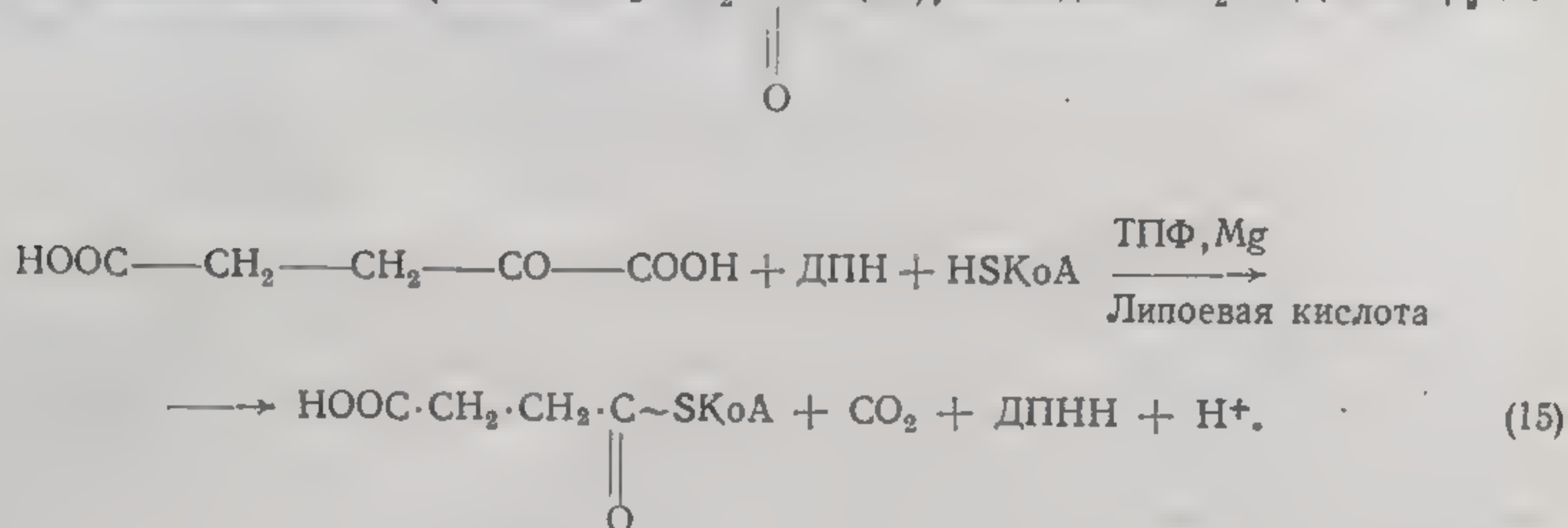
Однако разделение этой дегидрогеназы и фермента, обуславливающего окислительное декарбоксилирование изолимонной кислоты с образованием α -кетоглутаровой, не осуществлено.

Наконец, в животных тканях обнаружен еще один фермент ДПН — дегидрогеназа изолимонной кислоты, также обуславливающий превращение изолимонной кислоты в кетоглутаровую. Этот фермент характеризуется значительно меньшей устойчивостью и в качестве кофермента требует не ТПН, а ДПН.

В итоге рассмотренных реакций в лимоннокислом цикле происходит второе дегидрирование с акцептированием водорода ТПН или ДПН и второе декарбоксилирование.

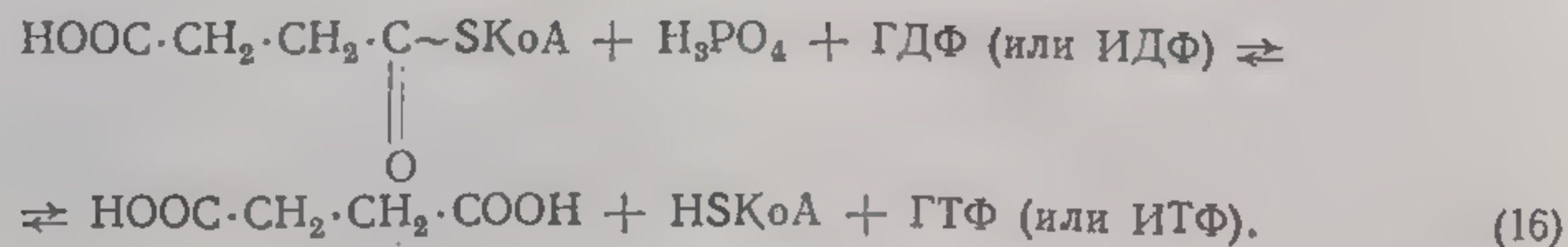
Д. Следующей реакцией является окислительное декарбоксилирование α -кетоглутаровой кислоты, механизм которого практически идентичен с рассмотренным ранее (раздел А) для превращений пировиноградной кислоты.

Дегидрогеназа кетоглутаровой кислоты — белок с молекулярным весом около 2 000 000. Коферментами и в данном случае являются ТПФ, липоевая кислота, HS КоА, ДПН и Mg. В результате ряда реакций образуется сукцинил-КоА, (HOOC·CH₂·CH₂·C~SKoA), свободная CO₂ и ДПНН + H⁺:



Фермент получен из сердца свиньи в очищенном виде с активностью, в 140 раз превышающей исходную. Детали реакций и последовательность превращений, приводящих к образованию сукцинил-КоА, изучены недостаточно. Рассмотренный процесс представляет собой третье декарбоксилирование и третье дегидрирование в лимоннокислом цикле. Акцептором водорода служит и в данном случае ДПН.

Е. Образование из сукцинил-КоА свободной янтарной кислоты может произойти по крайней мере двумя путями: прежде всего в результате действия так называемого «Р₁-энзима» — фермента, обеспечивающего образование богатого энергией фосфорного соединения в результате расщепления сукцинил-КоА в присутствии неорганического Р и ГДФ или ИДФ. Реакция протекает по уравнению:

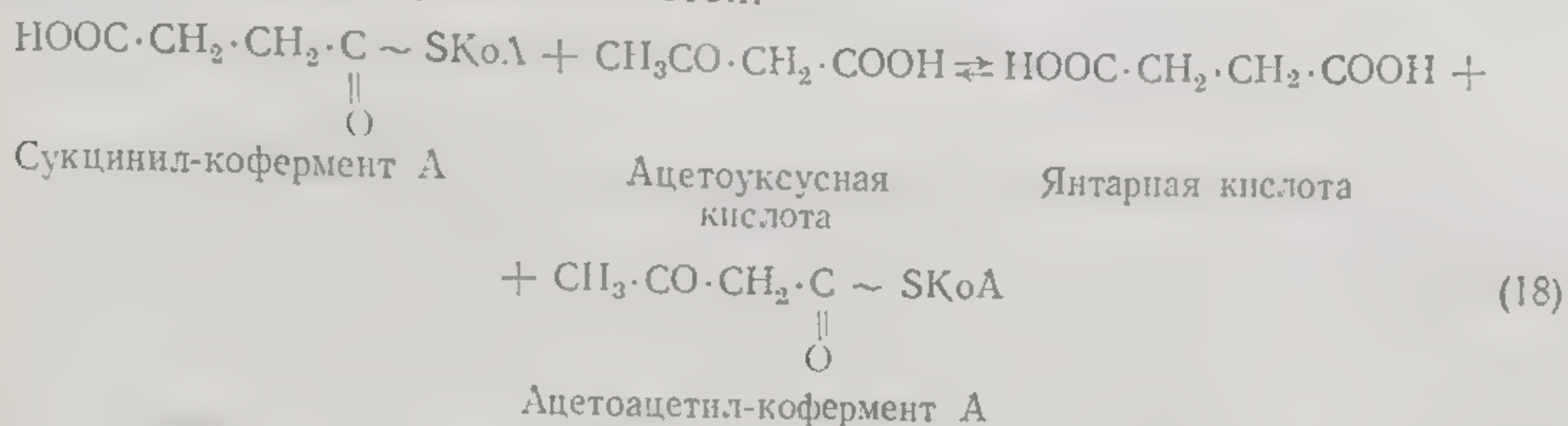


Образовавшиеся ГТФ или ИТФ передают конечную фосфатную группу адеиноловой системе с образованием АТФ:



В физиологических условиях равновесие в реакции (16) сдвинуто в сторону образования свободного кофермента А и нуклеозидтрифосфатов. Образование АТФ в этом процессе

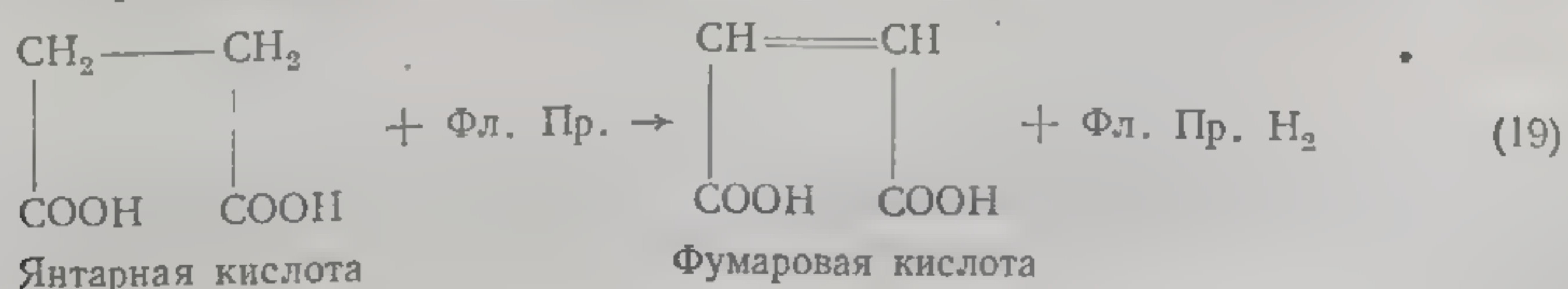
Освобождение янтарной кислоты из сукцинил-кофермента может произойти, как уже сказано, также в результате другой реакции, не связанной с «Р₁-энзимом». Речь идет об обратном процессе, протекающем между сукцинил-Ко и ацетоуксусной кислотой:



Не предпреляя последующих путей превращения ацетоацетил-КоА, можно лишь констатировать, что свободная янтарная кислота образовалась без возлечения минерального фосфата в процесс эстерификации и, следовательно, на этом этапе фактически отсутствовала реакция «субстратного фосфорилирования». Все остальные случаи окислительного фосфорилирования не являются «субстратными», а связаны с переносом электронов и протонов в дыхательной цепи, т. е. от восстановленного дифосфопиридин-нуклеотида до молекулярного кислорода.

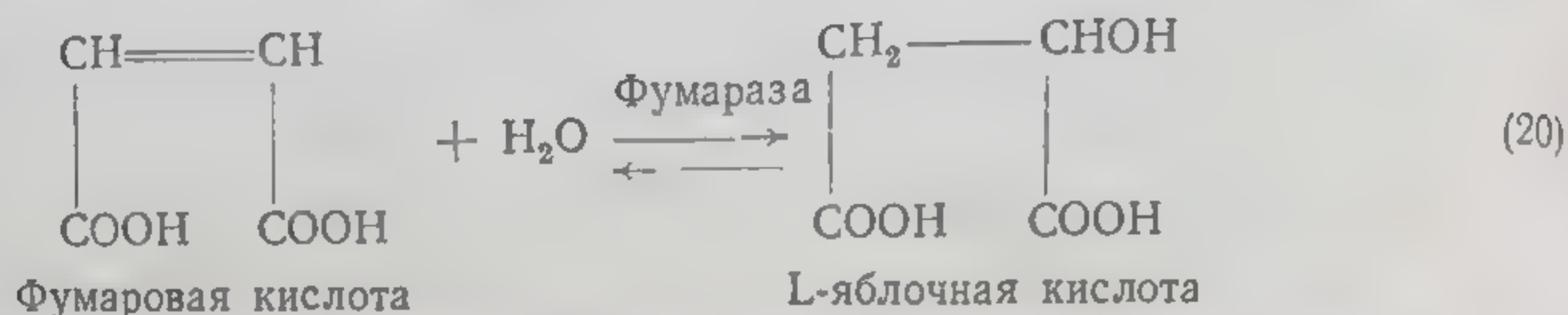
Ж. Дегидрирование янтарной кислоты — процесс весьма своеобразный. Он катализируется ферментом — сукциндегидрогеназой, по структуре являющимся флавопротеном, прочно фиксированным в составе митохондриальных структур. Считается, что сукциндегидрогеназа содержит значительное количество Fe, не входящего в состав гема, а соединенного, по-видимому, с SH-группами белка — фермента. Если принять, что в состав дегидрогеназы входит одна молекула флавина, то молекулярный вес фермента окажется равным 200 000.

Для освобождения флавиновой группировки из молекулы сукциндегидрогеназы ее необходимо подвергнуть воздействию протеолитических ферментов. Считают, что флавиновая часть фермента не идентична флавиндинуклеотиду, являющемуся компонентом оксидазы D-аминокислот. Частицы митохондрий, сохранившие при фрагментации митохондрий путем обработки различными растворителями сукциндегидрогеназную активность, содержат относительно небольшое количество (около 6%) липидов, а также цитохромы В и С. Изолировать сукциндегидрогеназу в достаточно очищенном виде в качестве индивидуального вещества до сих пор не удалось. Под влиянием сукциндегидрогеназы образуется фумаровая кислота:

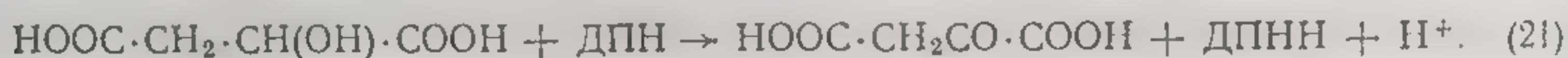


Отнятие у янтарной кислоты водорода является четвертым дегидрированием в лимоннокислом цикле. В данном случае процесс протекает без участия фосфопиридиннуклеотидов и фиксация водорода осуществляется флавопротеидами.

3. Фумаровая кислота обратимо превращается в L-яблочную кислоту под влиянием фермента фумаразы, выделенной в кристаллическом виде и представляющей собой электрофоретически гомогенный белок с молекулярным весом около 200 000. Равновесие между фумаровой и яблочной кислотами сдвинуто при реакции, близкой к нейтральной, и температуре 25° в сторону яблочной кислоты, концентрация которой в 4—4½ раза больше фумаровой:



И. Дегидрогеназа яблочной кислоты обеспечивает последнее, пятое дегидрирование в лимоннокислом цикле, протекающее с образованием ДПНН+Н⁺ и щавелевоуксусной кислоты:



Фермент может быть хорошо очищен от примесей других ферментов, за исключением дегидрогеназы молочной кислоты; его растворы в 0,1 М водном растворе фосфата при pH 4 и 0° весьма стабильны. Щавелевоуксусная кислота является компонентом реакции конденсации с ацетил-КоА, приводящей к образованию лимонной кислоты.

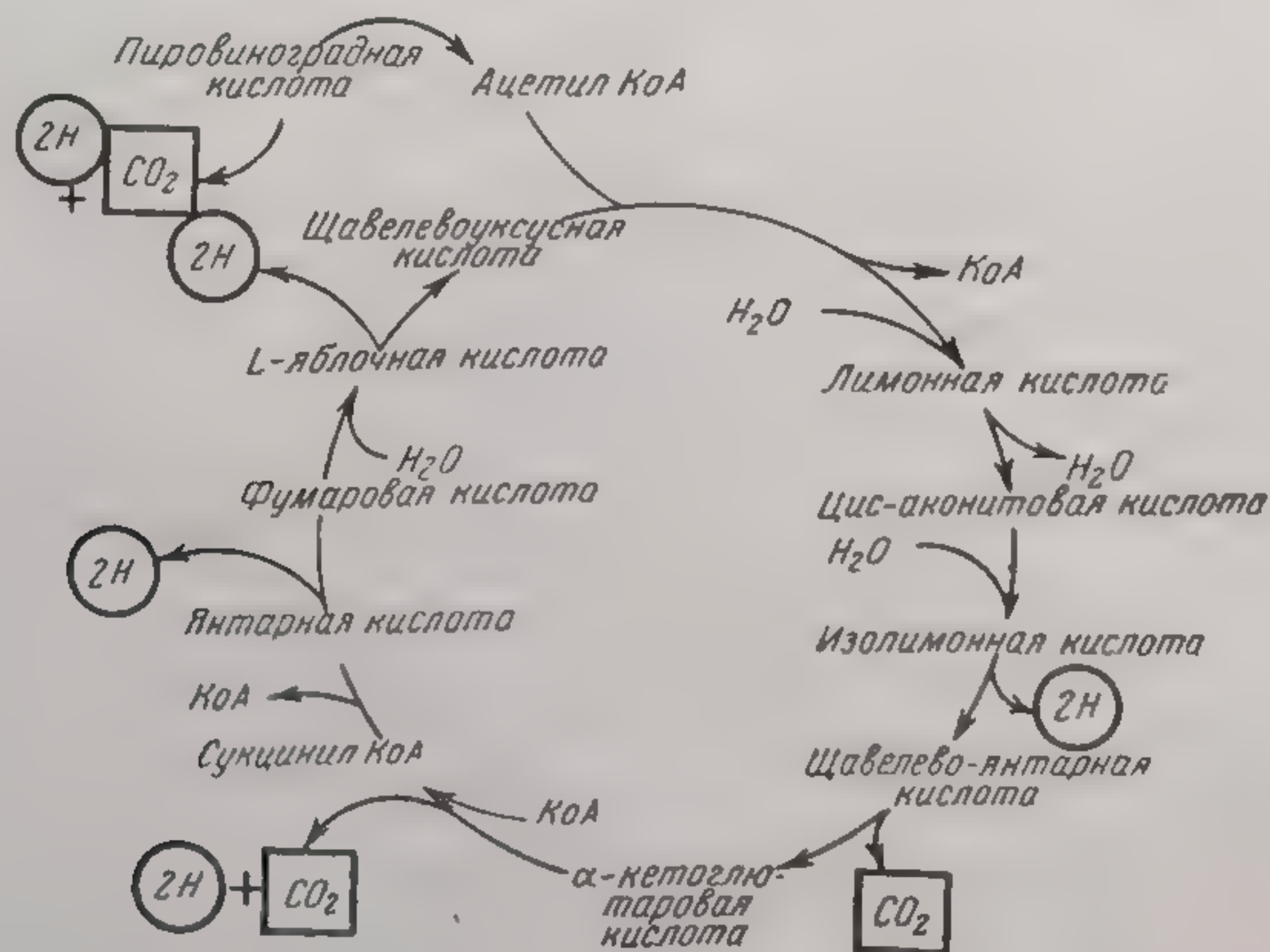


Рис. 1. Лимоннокислый цикл (по Кребсу и Корнбергу).

Вещества, которые вступают в цикл (КоА, Н₂О) после реакций, приводящих к начальной конденсации одной молекулы ацетил-КоА и одной молекулы щавелевоуксусной кислоты, помещены внутри кольца; образующиеся вещества (2Н, СО₂, Н₂О) помещены снаружи.

Таким образом, при окислении молекулы пировиноградной кислоты в лимоннокислом цикле она превращается в СО₂ и Н₂О; при этом происходит последовательное пятикратное дегидрирование участников цикла и трое-

кратное декарбоксилирование. Участвующая в процессе образования лимонной кислоты щавелевоуксусная кислота выходит из окислительных превращений без изменений и, следовательно, выполняет как бы каталитическую роль. Схематически химические превращения, характерные для лимоннокислого цикла, представлены на рис. 1.

Хотя каждый последующий акт дегидрирования может произойти лишь в результате образования надлежащего вещества в итоге предыдущих реакций, все же процессы дегидрирования разных соединений — субстратов лимоннокислого цикла — протекают независимо друг от друга. Если тканевая система окислительных ферментов не нарушена, то отщепляющийся от того или другого субстрата водород будет перенесен в процессе тканевого дыхания через систему промежуточных переносчиков на молекулярный кислород с образованием в конце концов молекулы воды. Энергетическая эффективность полного окисления пировиноградной кислоты составляет 273,2 ккал на моль. Итог всех реакций полного окисления пировиноградной кислоты в лимоннокислом цикле может быть представлен в следующем виде:



Возникает вопрос об энергетической эффективности каждой реакции цикла в отдельности. Данные Бэртона представлены в табл. 2.

Таблица 2

Энергетическая эффективность отдельных реакций
цикла трикарбоновых кислот

Реакция	При pH 7, ккал
Пируват ⁻ + $\frac{1}{2}\text{O}_2$ + КоА + Н ⁺ → ацетил-КоА + Н ₂ О + СО ₂	-61,8
Оксалацетат ⁻ + ацетил-КоА + Н ₂ О → цитрат ⁻ + КоА + Н ⁺	- 7,5
Цитрат ⁻ → цисаконитат ⁻ + Н ₂ О	+ 2,04
Цисаконитат ⁻ + Н ₂ О → изоцитрат ⁻	- 0,45
Изоцитрат ⁻ + $\frac{1}{2}\text{O}_2$ + Н ⁺ → α-кетоглутарат ⁻ + Н ₂ О + СО ₂	-54,4
α-кетоглутарат + $\frac{1}{2}\text{O}_2$ + КоА + Н ⁺ → сукцинил-КоА ⁻ + Н ₂ О + СО ₂	-59,6
Сукцинил-КоА ⁻ + АДФ ⁻ + НРО ₄ ⁻ → сукцинат ⁻ + АТФ + КоА ⁻	- 0,77
Сукцинат ⁻ + $\frac{1}{2}\text{O}_2$ → фумарат ⁻ + Н ₂ О	-36,1
Фумарат ⁻ + Н ₂ О → малат ⁻	- 0,88
Малат ⁻ + $\frac{1}{2}\text{O}_2$ → оксалацетат ⁻ + Н ₂ О	-45,3
Пируват ⁻ + $2\frac{1}{2}\text{O}_2$ + Н ⁺ → 3СО ₂ + 2Н ₂ О	-273,2

Материал, приведенный в табл. 2, основывается на предположении, что каждое дегидрирование сопровождается переносом водорода, т. е. протонов и электронов Н — (Н⁺) + е, через всю цепь промежуточных переносчиков к кислороду и завершается реакцией образования воды. В связи с этим необходимо выяснить:

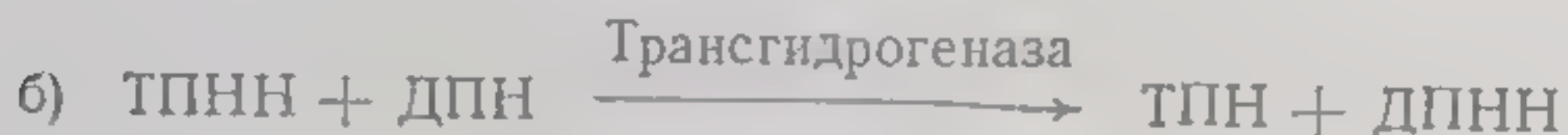
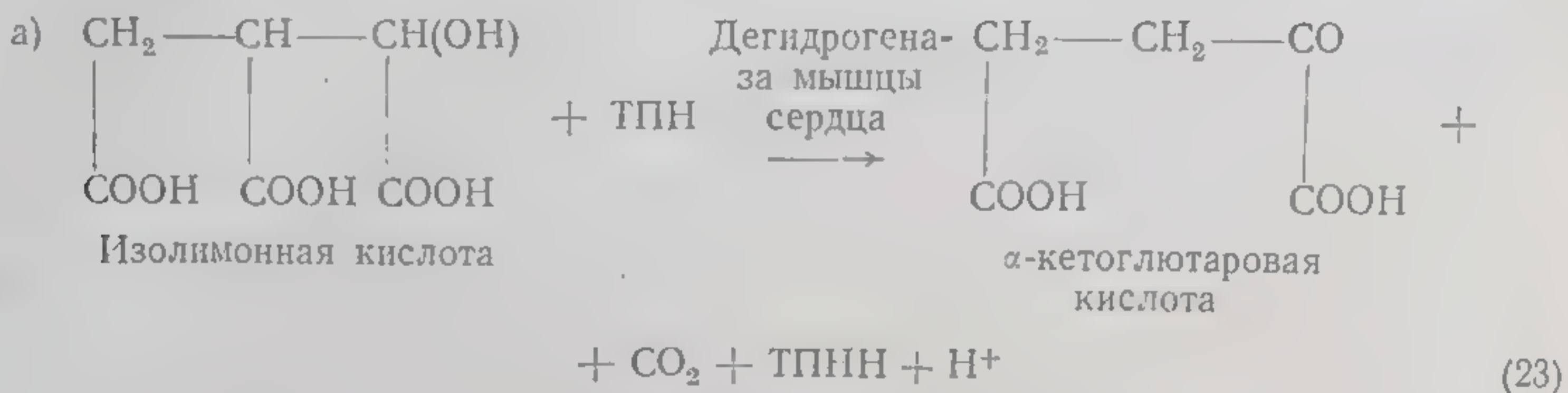
1. Каковы те вещества, которые участвуют в первичном акцептировании водорода, отщепляющегося пятикратно на протяжении лимоннокислого цикла, одинаковы ли они для всех субстратов окисления или различны.

2. Каково строение переносчиков, осуществляющих дальнейшую передачу водорода (протонов и электронов) по дыхательной цепи, т. е. после первичного акцептирования и до молекулярного кислорода — О₂; какова последовательность их расположения и связь между собой.

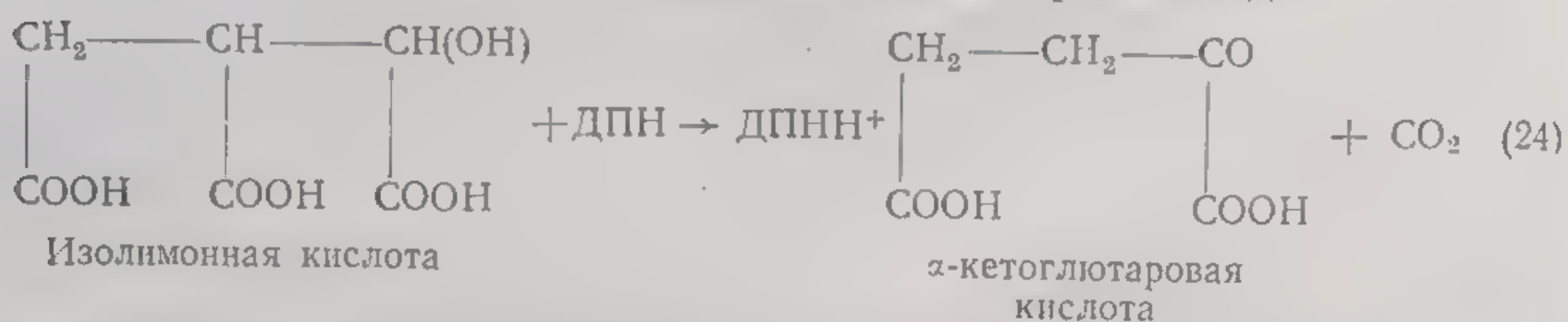
3. Каким образом и на каких этапах транспорт протонов и электронов сопряжен с образованием богатых энергией фосфорных соединений.

АКЦЕПТОРЫ ВОДОРОДА И ЗАВЕРШАЮЩИЕ ЭТАПЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ

Из упоминавшихся пяти дегидрирований четыре осуществляются дегидрогеназами, в состав которых в качестве кофермента входит ДПН. Это относится к дегидрогеназам пировиноградной, кетоглутаровой, яблочной и изолимонной кислот. Правда, в последнем случае более активен фермент, акцептирующий водород с помощью ТПН. В этом случае образуется ТПНН, который, однако, в силу трансгидрогеназной реакции передает водород дифосфопиридиннуклеотиду, обуславливая его восстановление. В этом случае реакция дегидрирования изолимонной кислоты должна быть изображена следующим образом:



При суммировании двух реакций уравнение примет вид:



Так как реакция 23б практически необратима (по крайней мере в мышце сердца), то можно принять, что и в этом случае акцептором водорода служит ДПН. Таким образом, четыре дегидрирования приводят к образованию ДПНН. Количества дифосфопиридиннуклеотида в тканях не бывают значительными. Следовательно, для повторений акта дегидрирования ДПНН должен вновь перейти в окисленную форму. В дегидрогеназах субстратов лимоннокислого цикла как ДПН, так и ДПНН не являются прочно связанными — диссоциация комплекса белок — ДПН или белок — ДПНН представлена в большей или меньшей степени для каждой дегидрогеназы. Благодаря этому в митохондриях (а также в глалоплазме) ДПН и ДПНН находятся как в связанном состоянии с белками — апоферментами, так и в свободном виде. Благодаря этому образовавшийся в процессе дегидрирования ДПНН замещается на ДПН, чем и определяется дальнейшая возможность дегидрогеназ осуществлять акт дегидрирования специфических для них субстратов. Описанные соотношения, т. е. специфичность действия дегидрогеназ, транспорт водорода после осуществленного акта дегидрирования в виде комплекса белок — ДПНН, обмен ДПНН со свободным ДПН и накопление в митохондриях неспецифического, общего для действия всех четырех дегидрогеназ продукта — свободного ДПНН, схематически представлены на рис. 2. Уравнение реакции может быть изображено в следующем виде:



где SH_2 — субстрат, вступающий в реакцию дегидрирования, а S — продукт окисления.

Действие сукциндегидрогеназы рассмотрим отдельно. Выше уже упоминалось о том, что сукциндегидрогеназа представляет собой флавопротеид, способный принимать на себя водород янтарной кислоты. Этот флавопротеид часто обозначается как флавопротеид I. Фермент, окисляющий восстановленную форму дифосфопиридиннуклеотида — дегидрогеназа

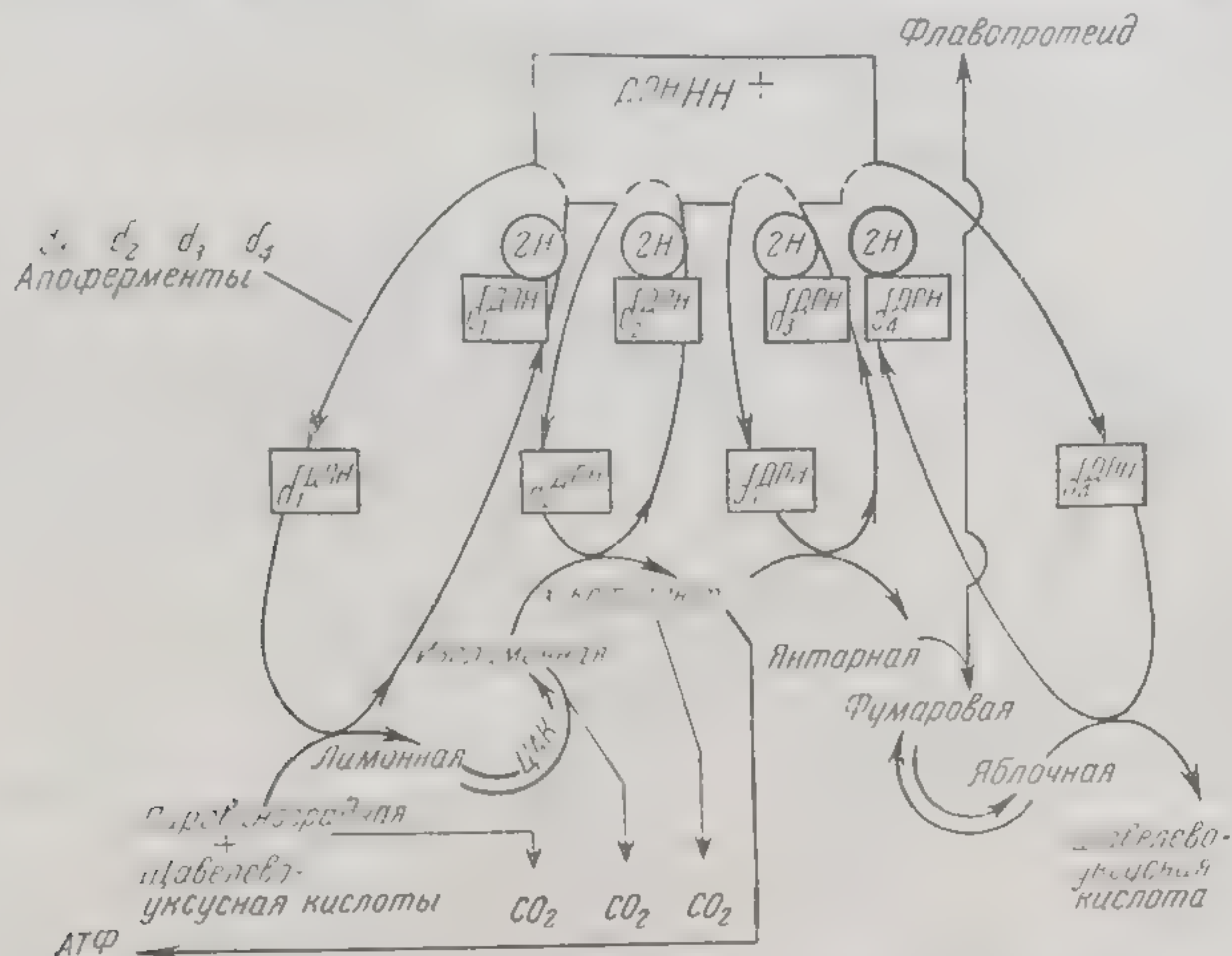
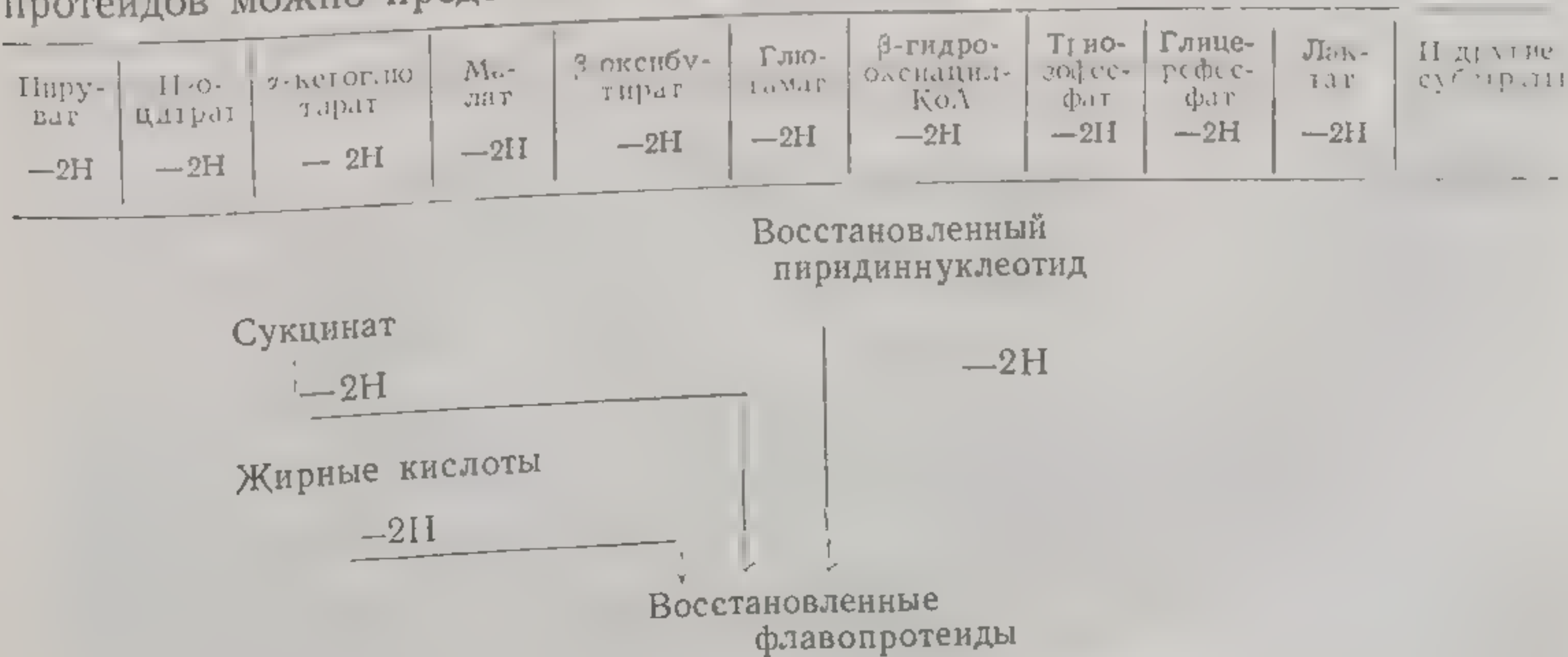


Рис. 2. Схема дегидрирования субстратов лимоннокислого цикла специфическими дегидрогеназами, состоящими из специфических белков b_1 , b_2 , b_3 и b_4 , образующих диссоциирующие соединения.

ДПНН, также является флавопротеидом, хотя и отличающимся как по структуре белка, так и флавинового компонента. Для дегидрогеназы ДПНН принято название «флавопротеид II». К флавопротеидам относится также дегидрогеназа жирных кислот. Этот флавопротеид — ацил-КоА дегидрогеназа — находится, как и предыдущие, в митохондриях, однако обладает рядом характерных особенностей и не участвует непосредственно в лимоннокислом цикле.

Схематически реакцию биологического окисления различных субстратов до стадии образования восстановленных пиридиннуклеотидов и флавопротеидов можно представить в следующем виде:



Приведенная схема демонстрирует, что первичным акцептором водорода часто является находящийся в составе дегидрогеназ ДПН. Восстановленный ДПН служит объектом действия специального фермента флавопротеиновой природы — флавопротеида II. Он содержит, кроме белка и флавиннуклеотида, много липоидов, на долю которых, по данным Грина, приходится 85% сухого веса. Сукциндегидрогеназа — флавопротеид I — содержит 15% липоидов и является первичным акцептором водорода янтарной кислоты.

Дальнейшие реакции у флавопротеидов I и II происходят с цитохромной системой.

Цитохромы представляют собой сложные вещества — хромопротеиды, в состав которых, помимо белка, входят железопорфирины, несколько отличающиеся друг от друга в различных цитохромах. К настоящему времени получены в индивидуальном очищенном состоянии 4 вещества, характерные для животного организма — это цитохромы *a*, *b*, *c*₁ и *c*. В цитохромах *b* и *a* простетическая группа — гем — может быть отделена от белка обработкой кислым ацетоном; в цитохромах *c*₁ и *c* связь между простетической группой и белком значительно более прочная.

Цитохром *a* — нерастворимое в воде полимерное соединение. Недавно (1959) было сообщено, что цитохром *a* может быть получен в виде мономера (молекулярный вес 72 000), растворимого в воде. На весовое количество в 72 000 г приходится одна молекула гема и две частицы меди.

Согласно первоначальным данным Кейлина, цитохром *a* представляет собой смесь двух цитохромов *a* и *a*₃ с очень близкими спектральными характеристиками. Отличие заключалось в том, что *a*₃ самоокисляется и реагирует с цианидами и СО. Строгих доказательств наличия двух компонентов в составе дыхательного фермента — цитохромоксидазы — не найдено. Согласно исследованиям Окунуки, окисленная форма цитохрома *a* тождественна цитохрому *a*₃. Таким образом, можно пользоваться как обозначением цитохром *a*, так и цитохром *a*₃ или «цитохромоксидаза» для того конечного звена дыхательной цепи, которое способно реагировать с О₂.

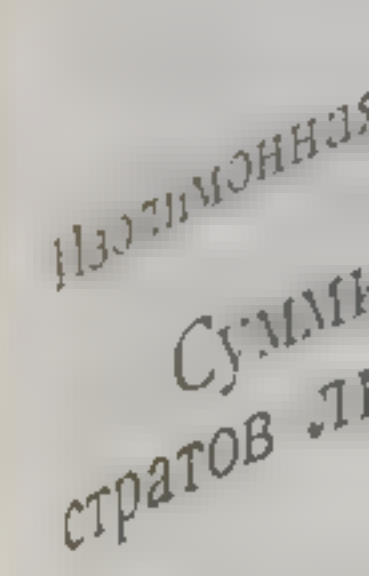
Цитохром *b* получен из сердца млекопитающих в виде растворимого в воде соединения в результате обработки детергентом — бромидом цетилдиметил-этил-аммония. Молекулярный вес выделенного продукта около 20 000. Однако применение детергента сопровождается, по-видимому, разрушением полимера, молекулярный вес которого установить не удалось.

Цитохром *c* является наиболее изученным из всех цитохромов и представляет собой белок основного характера, обладающий молекулярным весом 11 800 и соединенный с молекулой гематопорфирина или гема. Гем, содержащийся в составе цитохрома *c*, идентичен гему гемоглобина. Соединение между гемом и белком в цитохроме *c* осуществляется за счет тиоэфирных связей, образованных сульфгидрильными группами двух остатков цистеина, входящих в полипептидную цепь белка, с двумя винильными группами гема. Атом железа гема образует комплексное соединение с азотом имидазольного кольца гистидина, имеющегося в составе белка. Цитохром *c* растворим в воде. Он реагирует с О₂ очень медленно и может считаться неспособным к «самоокислению», т. е. к непосредственному окислению кислородом без участия промежуточных переносчиков электронов.

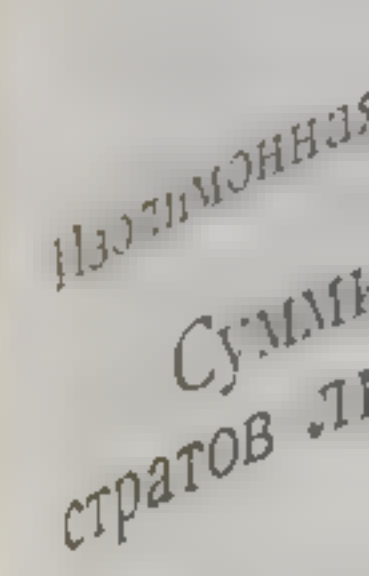
Цитохром *c*₁ в митохондриях соединен, по-видимому, с липоидами, количество которых в выделенных препаратах достигает 50% сухого веса. Освобожденный от липоидов цитохром *c*₁ получают в виде полимера с молекулярным весом 400 000. Полимер состоит из шести мономеров с молекулярным весом 70 000 каждый.

Для цитохромов весьма характерна способность давать полосы поглощения в видимой части спектра, а частично и в ультрафиолете (табл. 3).

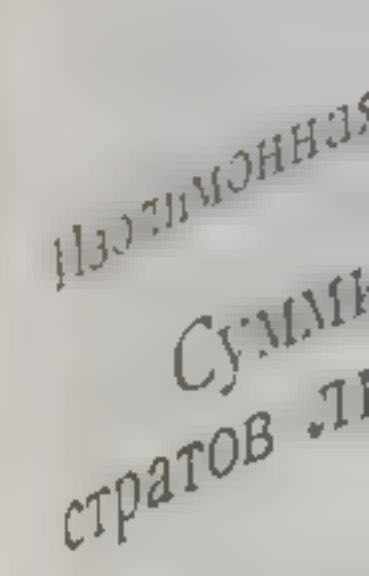
Итого
Сумма
стратов



Итого
Сумма
стратов л



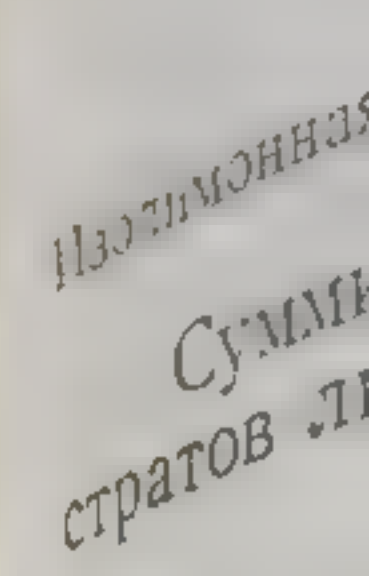
Итого
Сумма
стратов л



Итого
Сумма
стратов л

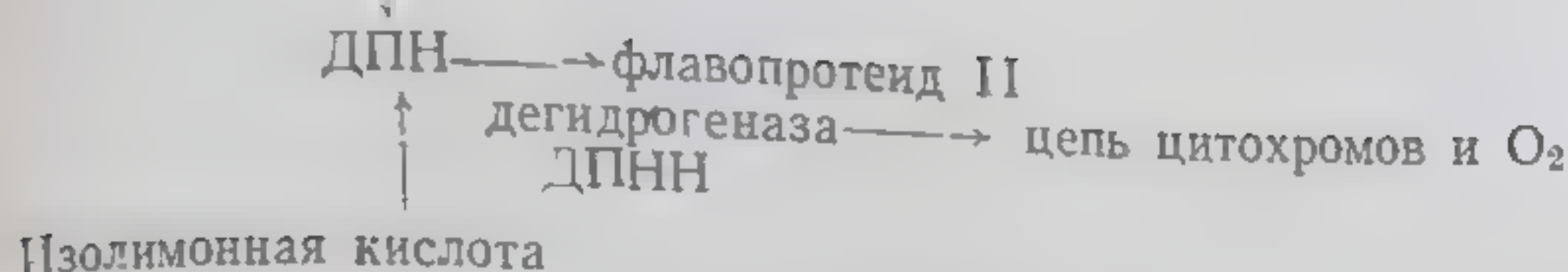
Итого
Сумма
стратов л

Итого
Сумма
стратов л



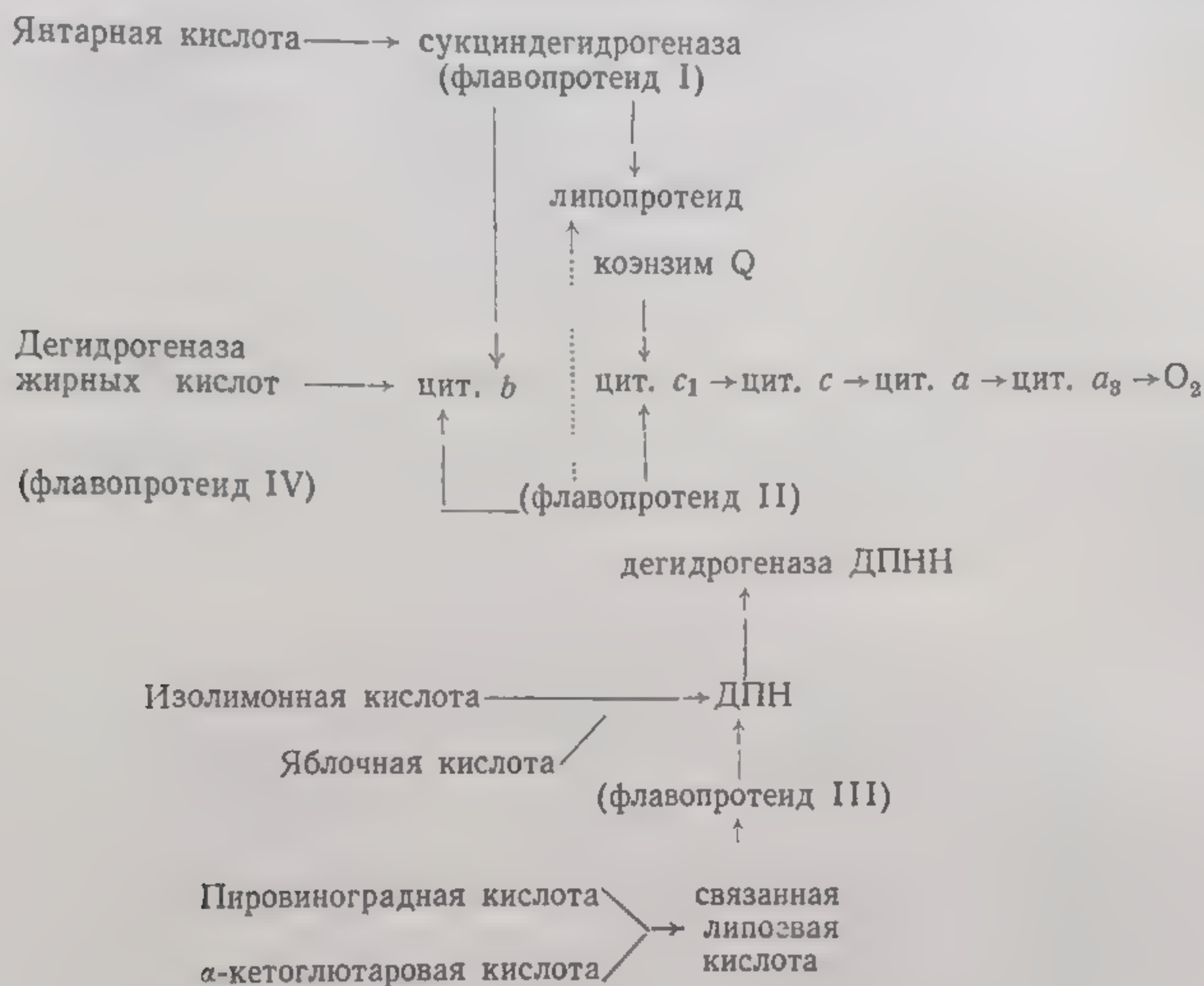
Итого
Сумма
стратов л

Яблочная кислота



Изолимонная кислота

Суммируя сказанное, отношения компонентов дыхательной цепи и субстратов лимоннокислого цикла можно представить в виде схемы:



Многие ее детали требуют, однако, уточнения.

Схема транспорта водорода (протонов и электронов), начиная с восстановленного дифосфопиридиннуклеотида, может быть представлена также в несколько упрощенном виде (рис. 3).

Рис. 3 дополняет рис. 2. Будучи соединенными вместе, они схематически демонстрируют процесс биологического окисления, начиная с субстратов лимоннокислого цикла и кончая переносом электронов через систему цитохромов на O_2 .

Подводя итоги, можно сказать, что главный путь биологического окисления начинается с действия специфических дегидрогеназ на различные субстраты, акцептирования водорода этих субстратов с помощью пиридин- и флавиннуклеотидов. Затем протоны (H^+) передаются в окружающую среду, а электроны (e^-) транспортируются через цитохромы (и цитохромоксидазу) на молекулярный кислород. Принявший электроны кислород и находящиеся в среде ионы водорода, взаимодействуя, образуют воду. Особенностью цитохрома a_3 или цитохромоксидазы является ее способность в отличие от цитохромов взаимодействовать с молекулярным кислородом, т. е. «самоокисляться». Эта способность может быть блокирована добавлением цианида, реагирующего с Fe^{3+} цитохромоксидазы и исключающего возможность пе-

редачи электронов на O_2 . Однако поглощение тканями O_2 при добавлении цианида до некоторой степени сохраняется — это так называемое цианрезистентное дыхание. Оно обусловлено наличием некоторых флавиновых ферментов, самоокисляющихся в присутствии кислорода, т. е. способных в восстановленной форме непосредственно реагировать с молекулярным кислородом. К числу таких оксидаз относится глицинооксидаза, оксидазы D-аминокислот, ксантинооксидаза и др. В результате действия этих ферментов названные субстраты окисляются, а водород, акцептированный фла-

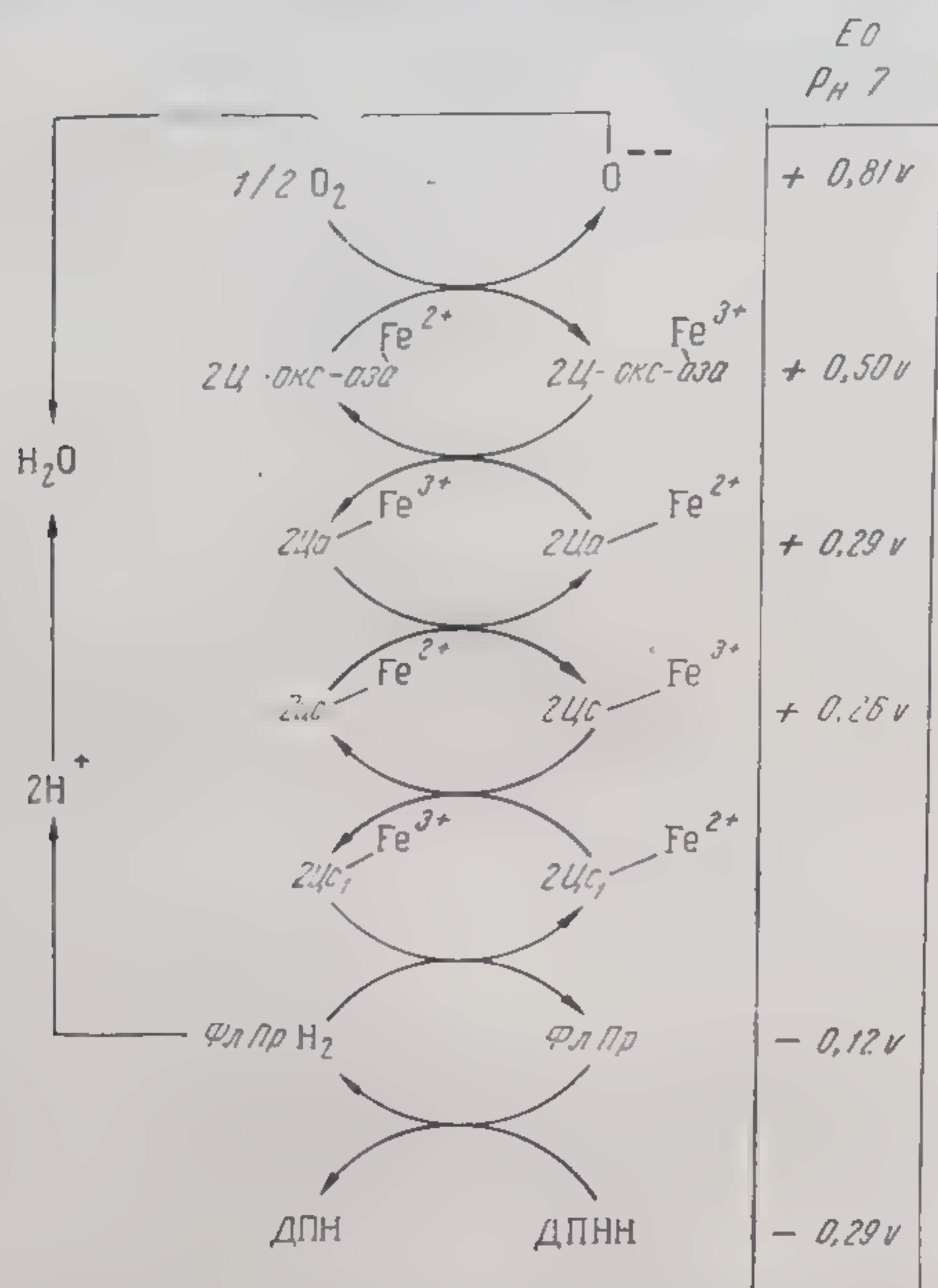
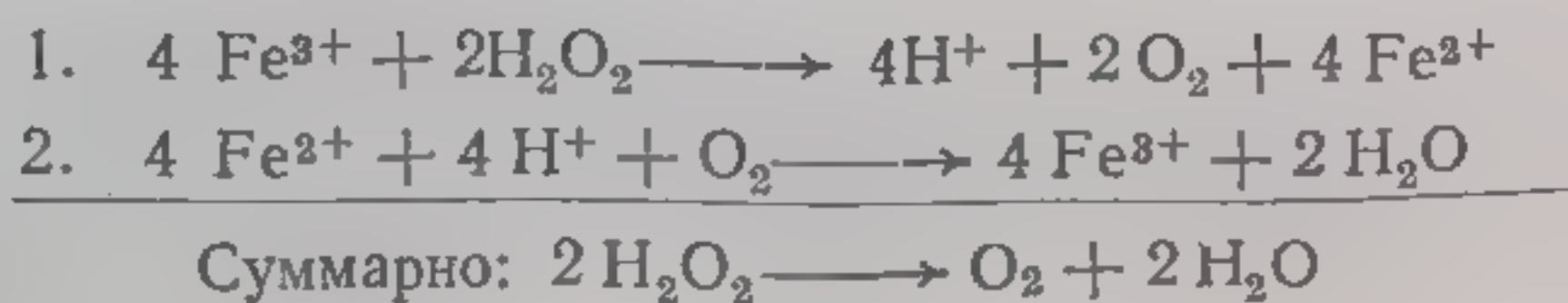


Рис. 3. Последовательность расположения флавопротеидов и цитохромов в дыхательной цепи и окислительно-восстановительные потенциалы этих систем.

вопротеидами, реагирует с O_2 , образуя H_2O_2 . В животных тканях очень широко распространен фермент каталаза. Под влиянием каталазы перекись водорода расщепляется с образованием O_2 и H_2O . Механизм этой реакции недостаточно выяснен. По-видимому, она протекает в два этапа: сначала перекись водорода восстанавливает Fe^{3+} каталазы в Fe^{2+} , освобождая при этом две молекулы кислорода. На втором этапе одна из молекул O_2 вновь окисляет Fe^{2+} каталазы, принимая на себя электроны и восстанавливаясь в воду:



Схематически совокупность реакций биологического окисления, сопровождающихся образованием H_2O_2 , может быть представлена следующим образом (рис. 4).

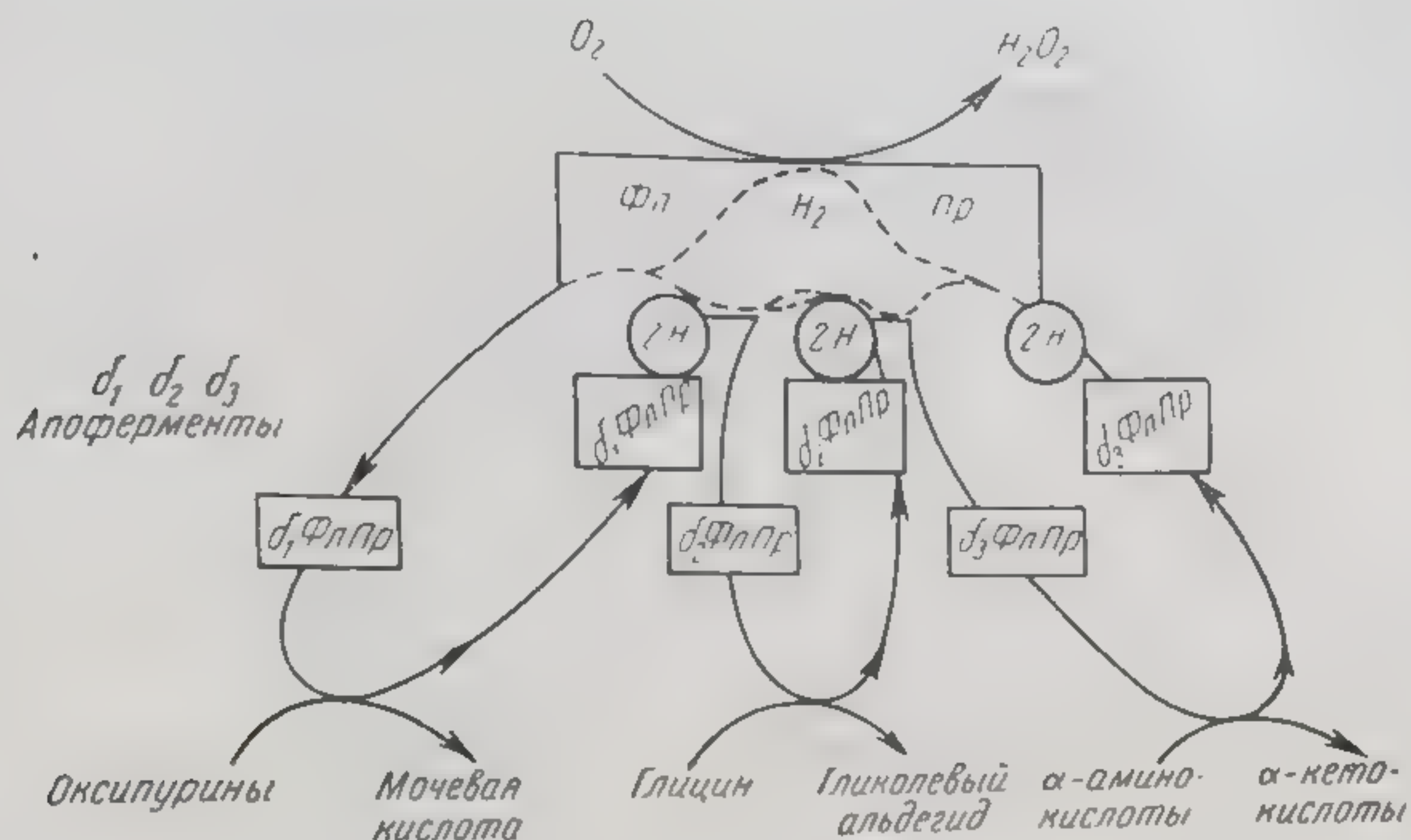


Рис. 4. Схема окисления ряда субстратов с помощью ферментов-флавопротеидов и дальнейшая реакция восстановленной формы флавопротеида с молекулярным кислородом, приводящая к образованию H_2O_2 .

d_1, d_2, d_3 — специфические белки-апоферменты дегидрогеназ.

Окислительное фосфорилирование

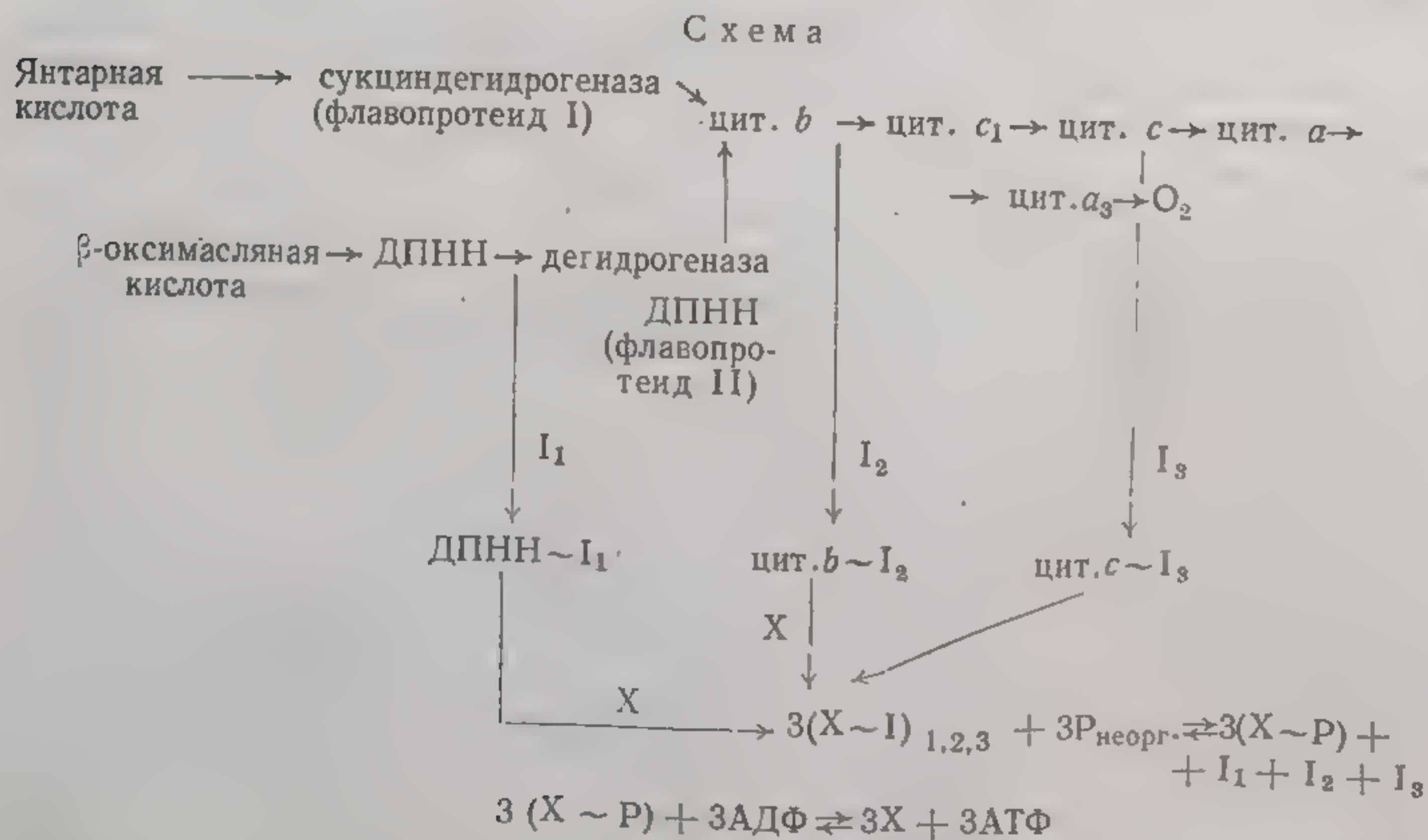
Энергия, освобождающаяся при процессах биологического окисления, реализуемых в лимоннокислом цикле, а также при транспорте водорода и электронов, частично рассеивается в виде тепла, а частично аккумулируется в виде богатых энергией соединений, главным образом в виде АТФ. Впервые на аккумуляцию энергии биологического окисления в виде АТФ указал В. А. Энгельгардт (1930). Роль транспорта водорода в дыхательной цепи в процессах фосфорилирования подчеркнул В. А. Белицер (1939), показав, что количество молей эстерифицированного минерального фосфата превосходит количество использованных на окисление атомов кислорода.

Окислительное фосфорилирование сопряжено с окислением определенных субстратов и с транспортом водорода и электронов в дыхательной цепи. Фосфорилирование, связанное с окислением субстратов, или субстратное фосфорилирование, в животных тканях представлено только одной реакцией окислительного декарбоксилирования α -кетоглутаровой кислоты. В сущности говоря, образование богатой энергией фосфатной связи связано лишь с превращением сукцинил-КоА под влиянием « P_i -фермента». Эта реакция уже рассмотрена и описана выше в разделах 16 и 17.

Значительно менее ясен механизм реакций окислительного фосфорилирования, сопряженных с переносом водорода и электронов в дыхательной цепи, т. е. с ДПНН на кислород. По-видимому, число фосфорилирований в цепи не превышает трех последовательных актов вовлечения минерального фосфата в соединения с органическими веществами. В случае окисления янтарной кислоты фосфорилирование повторяется лишь 2 раза. Отношение между количеством поглощенного кислорода при окислении какого-либо субстрата (выраженным в грамм-атомах кислорода) и количеством эстерифицированного фосфата (выраженного в грамм-атомах Р) называется коэффициентом окислительного фосфорилирования (P/O). Обычно фактически O_2 и связанный Р изображают в миллионных поглощенный в эксперименте O_2 и фосфора, т. е. в микроатомах $\mu a O$ и $\mu a P$.

При окислительном декарбоксилировании кетоглутаровой кислоты происходит одно субстратное фосфорилирование и три фосфорилирования в дыхательной цепи, т. е. коэффициент фосфорилирования для окисления кетоглутаровой кислоты составляет наибольшую величину: $P/O=4$. При окислении изолимонной, пировиноградной и яблочной кислот, а также других субстратов, окисление которых приводит к образованию ДПНН+Н⁺, коэффициент $P/O=3$. При окислении янтарной кислоты $P/O=2$. Вероятно, окисление не только восстановленной формы сукциндегидрогеназы (Фл. Пр. I Н₂), но и других флавопротеидов, находящихся в восстановленном состоянии при транспорте электронов через цитохромную систему на кислород, связано с образованием двух высокоэнергетических фосфатных связей. Механизм фосфорилирования остается неясным. Недостаточно изучена также локализация звеньев дыхательной цепи, участвующих в сопряженном фосфорилировании. Рассматривая этот вопрос, следует иметь в виду, что окисление пировиноградной, β-оксимасляной, яблочной кислот, а также других субстратов, дегидрирование которых сопровождается образованием ДПНН+Н⁺, характеризуется коэффициентом $P/O=3$.

При окислении янтарной кислоты, как уже отмечалось, $P/O=2$ и, наконец, при окислении восстановленного цитохрома с (цитохром с+аскорбиновая кислота) $P/O=1$. В связи с этими данными считается, что одно фосфорилирование сопряжено с окислением ДПНН+Н⁺, второе связано с передачей электронов с Фл. Пр. Н₂ на систему цитохромов и, наконец, третье фосфорилирование осуществляется при передаче электронов с цитохрома с на систему цитохромов а или на О₂. Согласно Чансу, образование АТФ является лишь завершающим актом окислительного фосфорилирования — ему предшествует образование связи, богатой энергией, в которой не участвует фосфатный остаток. Затем наступает второй этап реакции — фосфатный остаток вовлекается в богатое энергией соединение; наконец, на третьем этапе фосфатный остаток передается адениловой системе, т. е. на АДФ с образованием АТФ. Эти соотношения представлены в схеме.



Обозначения. I₁, I₂, I₃ — специфические для данного звена дыхательной цепи соединения, участвующие в образовании богатых энергией соединений; X — неспецифическое вещество, акцептирующее богатые энергией связи с остатками I₁, I₂ и I₃, сменяющее их на фосфатные остатки и переносящее последние на АДФ; P_{неорг.} — минеральный фосфат.

Факторы, способные нарушить в каком-либо звене связи между транспортом водорода и электронов в дыхательной цепи, с одной стороны, и фосфорилированием, с другой, характеризуют как «разобщающие» агенты. К ним относится очень большое количество соединений: 2,4-динитрофенол, азид, барбитураты, тироксин, некоторые антибиотики (антимидин, грамицидин) и др. Вещества, образовавшиеся в жидкой части клеточной протоплазмы, например при гликолизе, будут в присутствии O_2 подвергаться окислительным превращениям. Частично это окисление будет протекать на поверхности митохондрий без сопряжения с фосфорилированием. Благодаря проницаемости митохондриальных мембран возможно проникновение части образовавшихся в гиалоплазме веществ внутрь митохондрий, где их окисление может пойти по фосфорилирующему пути.

На схеме, взятой из работы А. Ленингера (рис. 5), показано, что субстрат окисления, β -оксимасляная кислота, проникает внутрь митохондрий и там подвергается окислению по пути, сопряженному с фосфорилированием. Образующийся в гиалоплазме вне митохондрий ДПН может при достаточной проницаемости оболочек митохондрий по крайней мере частично проникнуть внутрь и окисляться по тому же пути, что и образовавшийся внутри митохондрий. В то же время многие вещества, как субстраты окис-

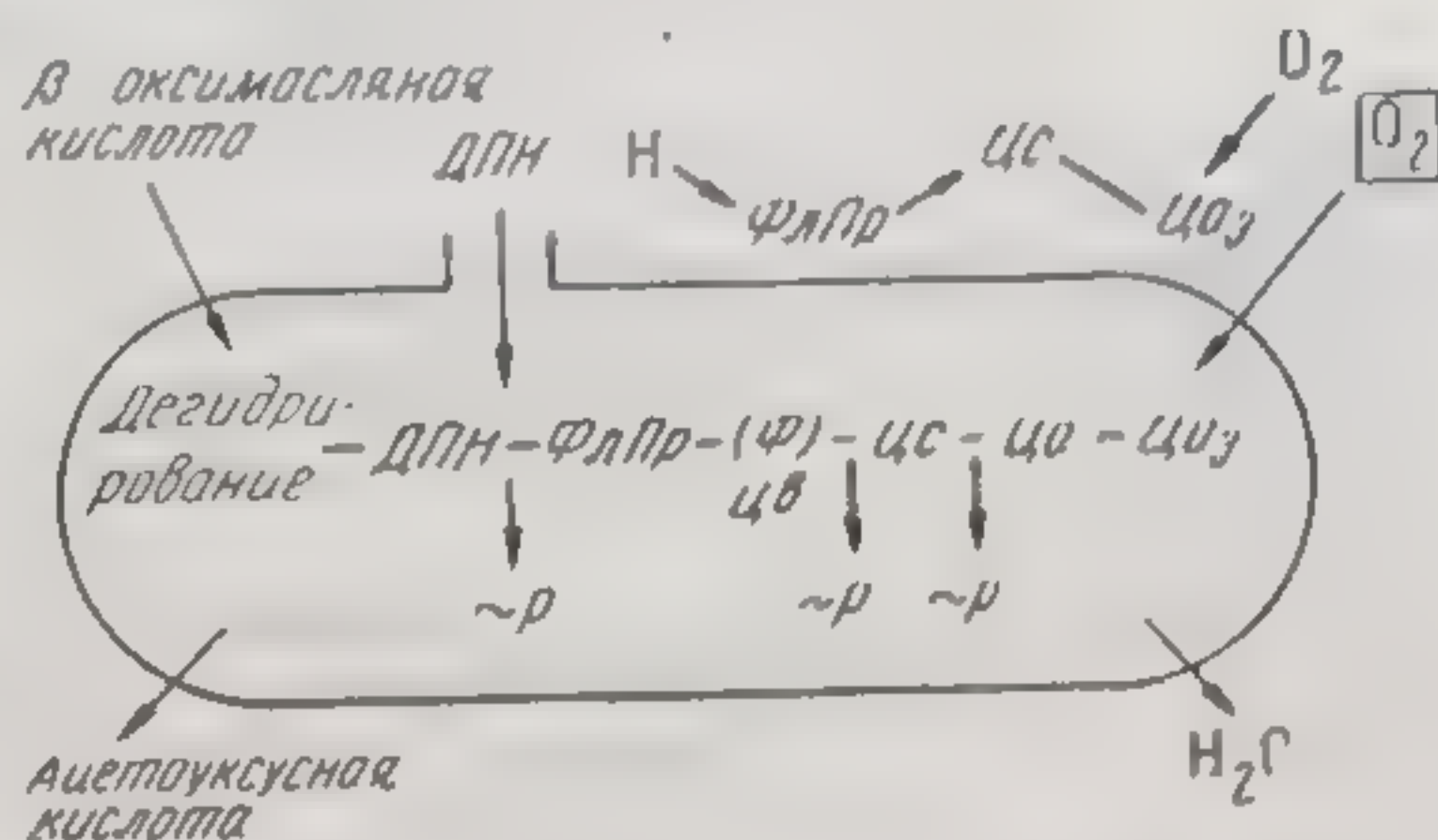


Рис. 5. Схематическое изображение окисления, протекающего внутри митохондрий, сопряженного с фосфорилированием, и на поверхности митохондрий, не сопровождающегося фосфорилированием.

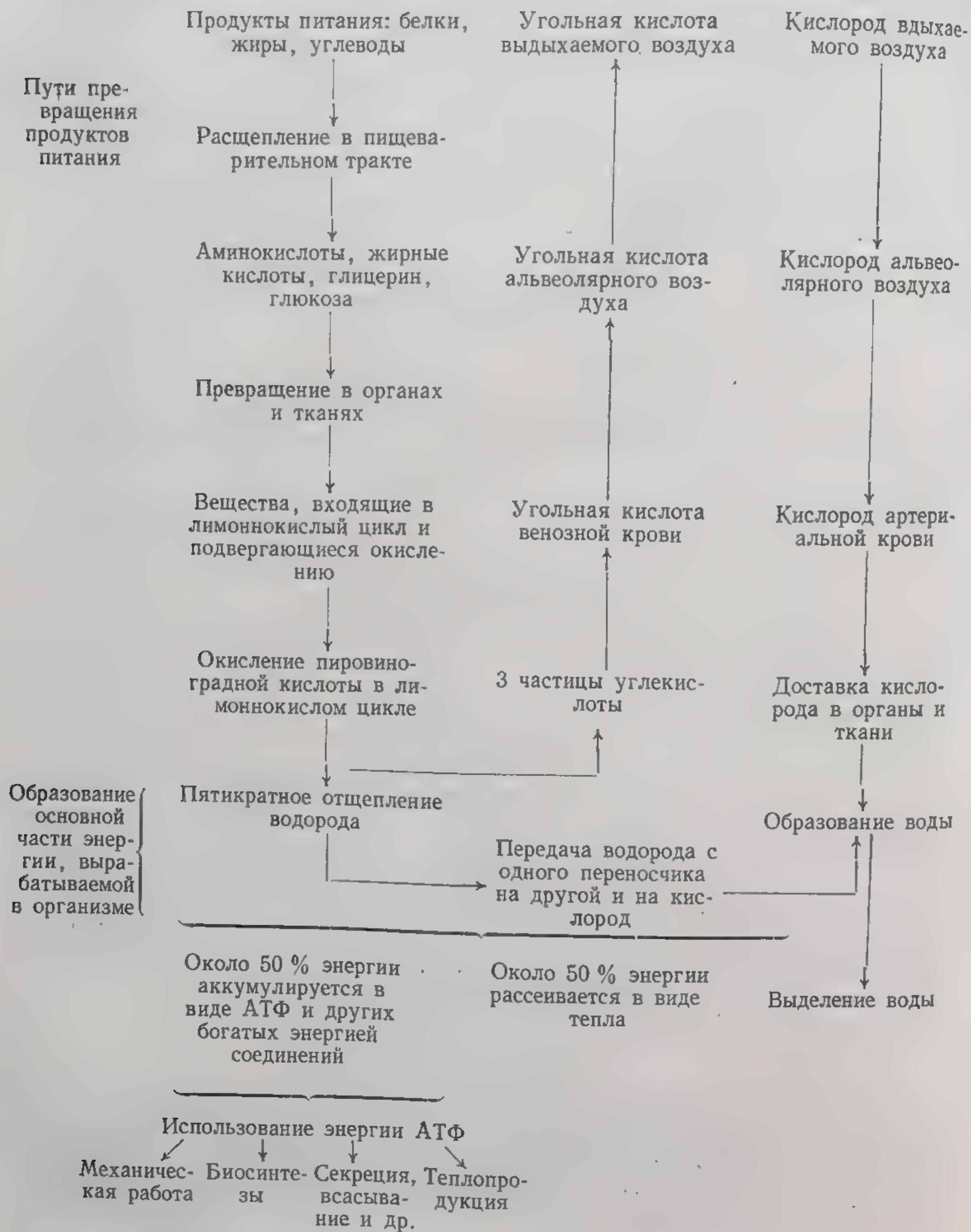
ления, так и переносчики водорода и электронов, мало проникают или вовсе не проникают внутрь митохондрий и окисляются на их поверхности. При этом промежуточные и конечные продукты биологического окисления будут практически теми же, что и при окислении внутри митохондрий, однако образования высокоэнергетических соединений не произойдет. Транспорт водорода и электронов внутри митохондрий также, по-видимому, возможен как по пути, сопряженному с образованием богатых энергией фосфорных соединений, так и независимо от него, по пути, свободному от фосфорилирования. Связь между дыханием и фосфорилированием в митохондриях разных органов неодинаково прочная: в митохондриях печени разобщение наступает легко, в сердце — гораздо труднее. Не только *in vitro* путем применения разобщающих агентов, но и *in vivo* благодаря многочисленным регуляторным механизмам обеспечивается возможность «переключения» внутримитохондриальных окислительных превращений с одного пути на другой. В физиологических условиях для митохондрий скелетных мышц голубя снижение Р/О установлено (В. П. Скулачев) в условиях гипотермии, а также в период бурного роста молодого организма, связанного с высокой интенсивностью процессов биосинтеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Жизнь любого организма не может протекать без постоянного обмена веществ с окружающей средой и других характерных проявлений жизни, связанных с использованием свободной энергии, содержащейся в клетках в легко утилизируемой форме — в виде богатых энергией фосфорных соединений и прежде всего АТФ.

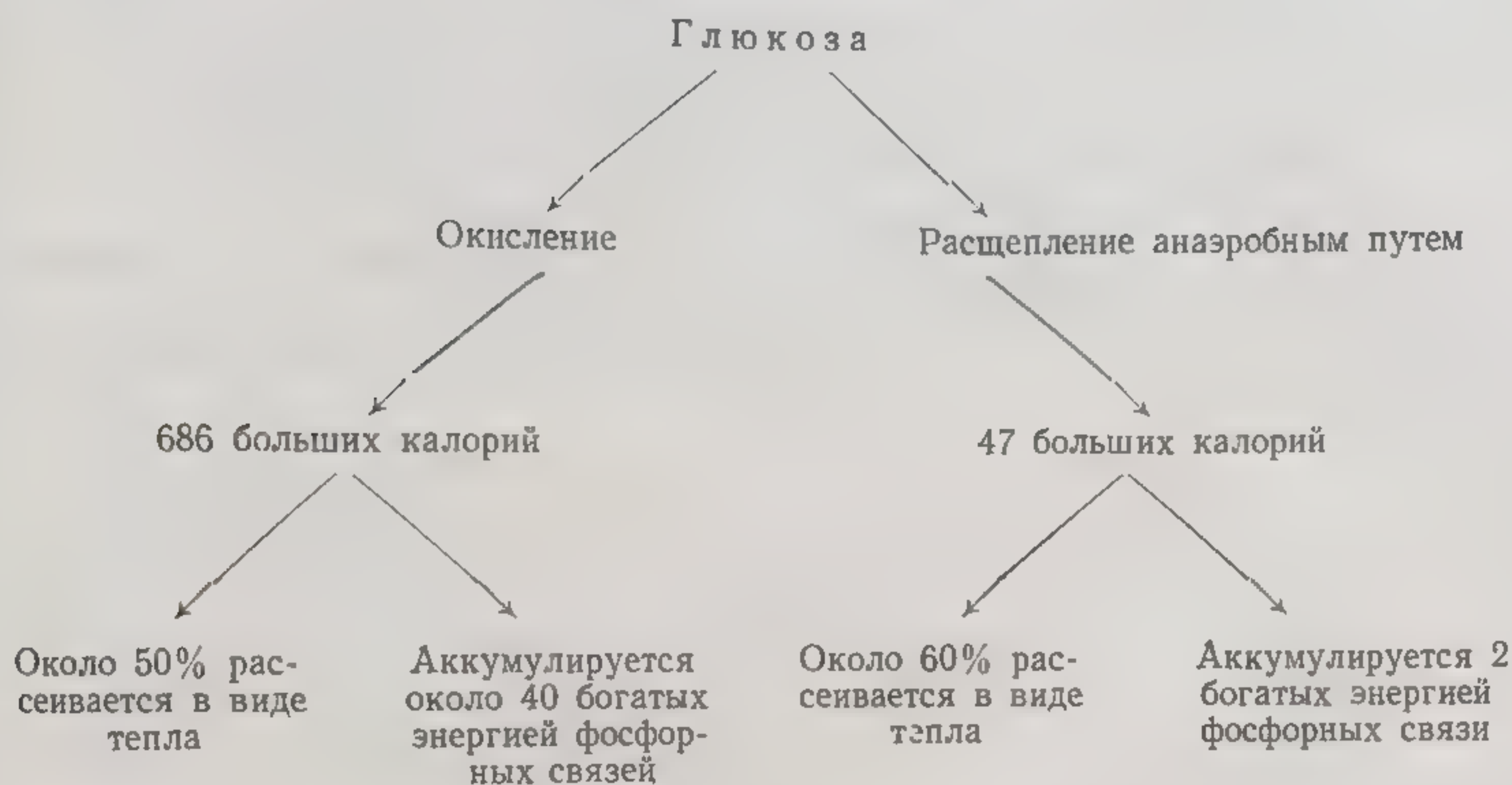
Беспрерывная трата АТФ при жизни требует и постоянного ее образования и возобновления. Это возможно при снабжении организма продуктами питания, часть которых окисляется с использованием кислорода вдыхаемого воздуха до воды и углекислоты. Для иллюстрации сказанного приведем схему, на которой представлены пути превращения продуктов питания, накопление энергии в виде богатых энергией фосфорных соединений (АТФ) и их использование:

Пути превращения продуктов питания, накопление энергии в виде богатых энергией фосфорных соединений (АТФ) и их использование



Как видно из схемы, энергия окисления лишь частично рассеивается в виде тепла (около 50%), частично же аккумулируется в виде богатых энергией фосфорных соединений (АТФ и др.), которые используются на различные процессы жизнедеятельности. При недостатке кислорода АТФ образуется в организме за счет сбраживания или анаэробного распада углеводов, гликолиза или гликогенолиза. Однако это малоэффективный путь, способный лишь временно и частично заменить окислительные процессы.

Сравнительная оценка энергетической эффективности окислительных процессов и анаэробных превращений (сбраживания) углеводов в животном организме и организме человека



Детальное исследование обмена энергии и выяснение всех промежуточных звеньев энергетических превращений в органах и тканях поможет управлять указанными процессами. Эта проблема является одной из наиболее существенных и интенсивно разрабатываемых в современной биохимии наравне с проблемами, касающимися структуры и функций белков и нуклеиновых кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Збарский Б. И., Иванов И. И., Мардашев С. Р. Биологическая химия. Изд. 3-е. Медгиз, 1960.
 2. Фердман Д. Л. Биохимия. Изд. Высшая школа, 1960.
 3. Straub B. Biochemie, Budapest, 1960.
 4. Metabolic Pathways v. 1. ed. by Greenberg, 1960. Methods in Enzymology, ed. by S.P. Colowick and N. O. Kaplan Acad. Press., 1955, v. I a. v. II.
- Кребс Г. и Корнберг Г. Превращения энергии в живых системах. ИЛ. 1959.

Дополнительная литература к I разделу

- Владимиров Г. Е. Некоторые новые данные по энергетической характеристике реакций гликолиза. Ученые записки Ленинградского университета, № 164. Серия биологические науки, 1954, в. 32, 328.
- Колотилова А. И. Скорости промежуточных реакций гликолиза. Успехи современной биологии, 1957, т. 43, в. I, 12.
- Владимиров Г. Е. The free energy of hydrolysis of adenosine triphosphoric acid. Nature, 1957, 179, 1350.
- Сейц И. Ф. Взаимодействие дыхания и гликолиза в клетке. Медгиз, 1961.

К о II разделу

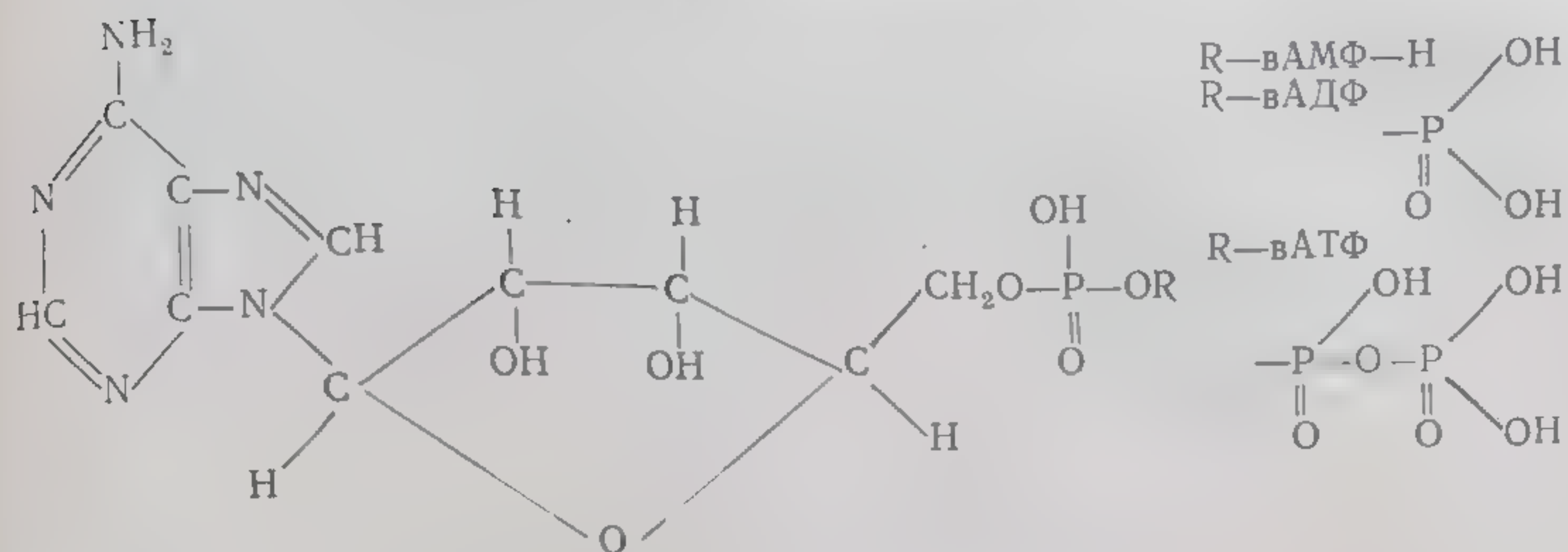
- К о л о т и л о в а А. И. Успехи современной биологии, 1958, 45, 133—149.
К о ч е т о в Г. А. Об окислительном пути превращения углеводов. Успехи биологической химии, 1958, 3, 243—273.
Ш о н к а И. и Е р м о л е н к о Р. Пептозный цикл и его значение в медицине. Вопросы медицинской химии, 1961, 7, в. 2, 115—120.

К III разделу

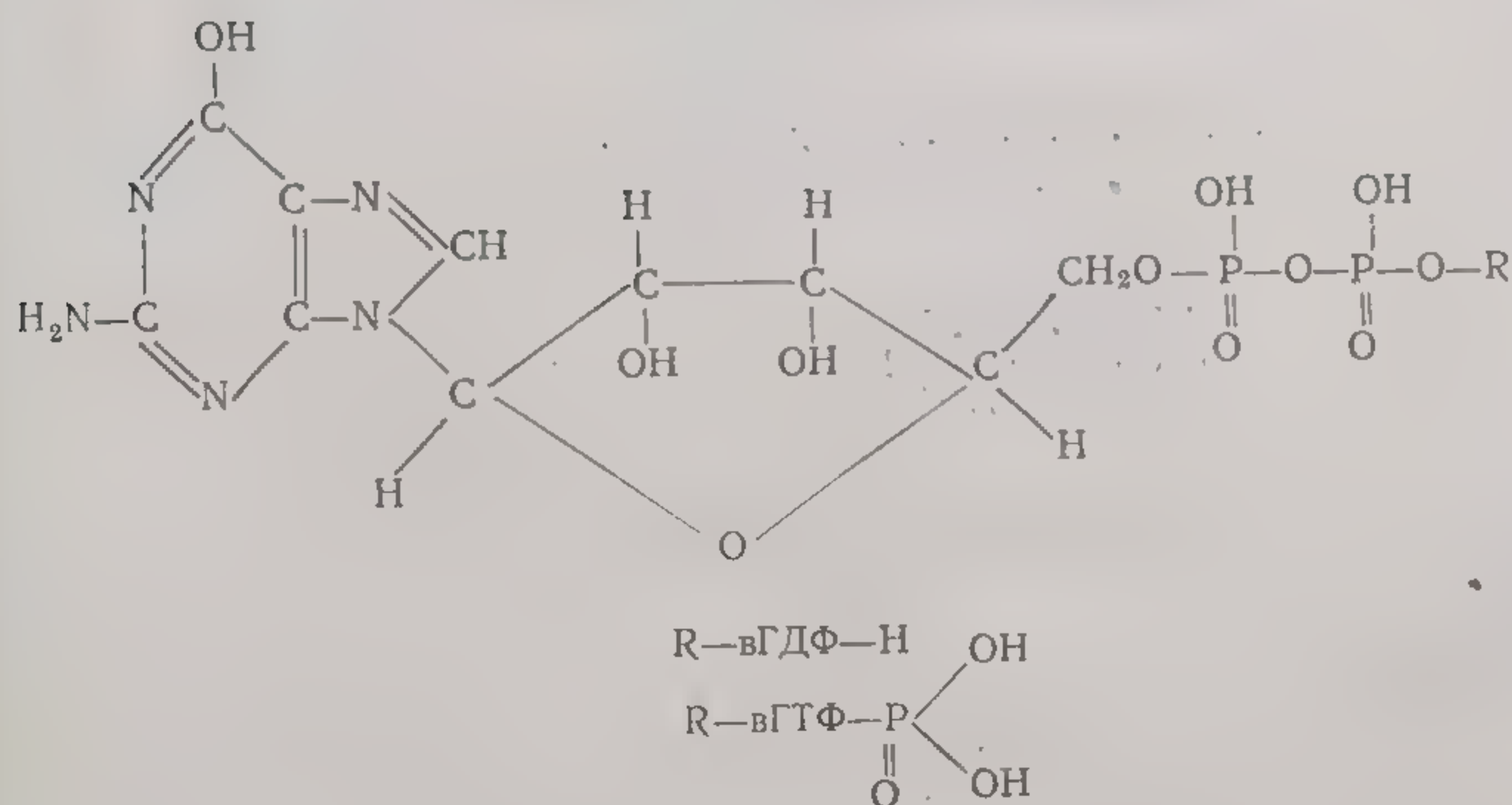
- Фосфорилирование и функция. Симпозиум 1958 г. ИЭМ., Л., 1960.
S c h n e i d e r W. Mitochondrial metabolism, Advances in Enzymology, 1959, 21, 2—61.
O s h o a S. Enzymic mechanism in the citric acid cycle Advances in Enzymology, 1954, 15, 183—263.
G r e e n D. Electron transport and oxidative phosphorylation, 1959, 21, 74—125.
C h a n c e B. Acid linked functions of intermediates in oxidative phosphorylation I. Chemical Equations. J. of Biol. Chem., 1959, 234, No 6, 1563—1567.
S l a t e r E. C. The constitution of the respiratory chain in animal tissues. Advanc. Enzymol., 1958, 20, 147—200.
L e h n i n g e r A. Harvey Lectures, 1953—1954, 49, 176.
Труды 5-го Международного биохимического Конгресса. Москва, 1961: 1) 5-й симпозиум; 2) пленарный доклад Д. Грина.
С к у л а ч е в В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. Изд. АН СССР, М., 1962.
-

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ ДЛЯ НЕКОТОРЫХ СОЕДИНЕНИЙ
И ИХ СТРУКТУРНЫЕ ФОРМУЛЫ:

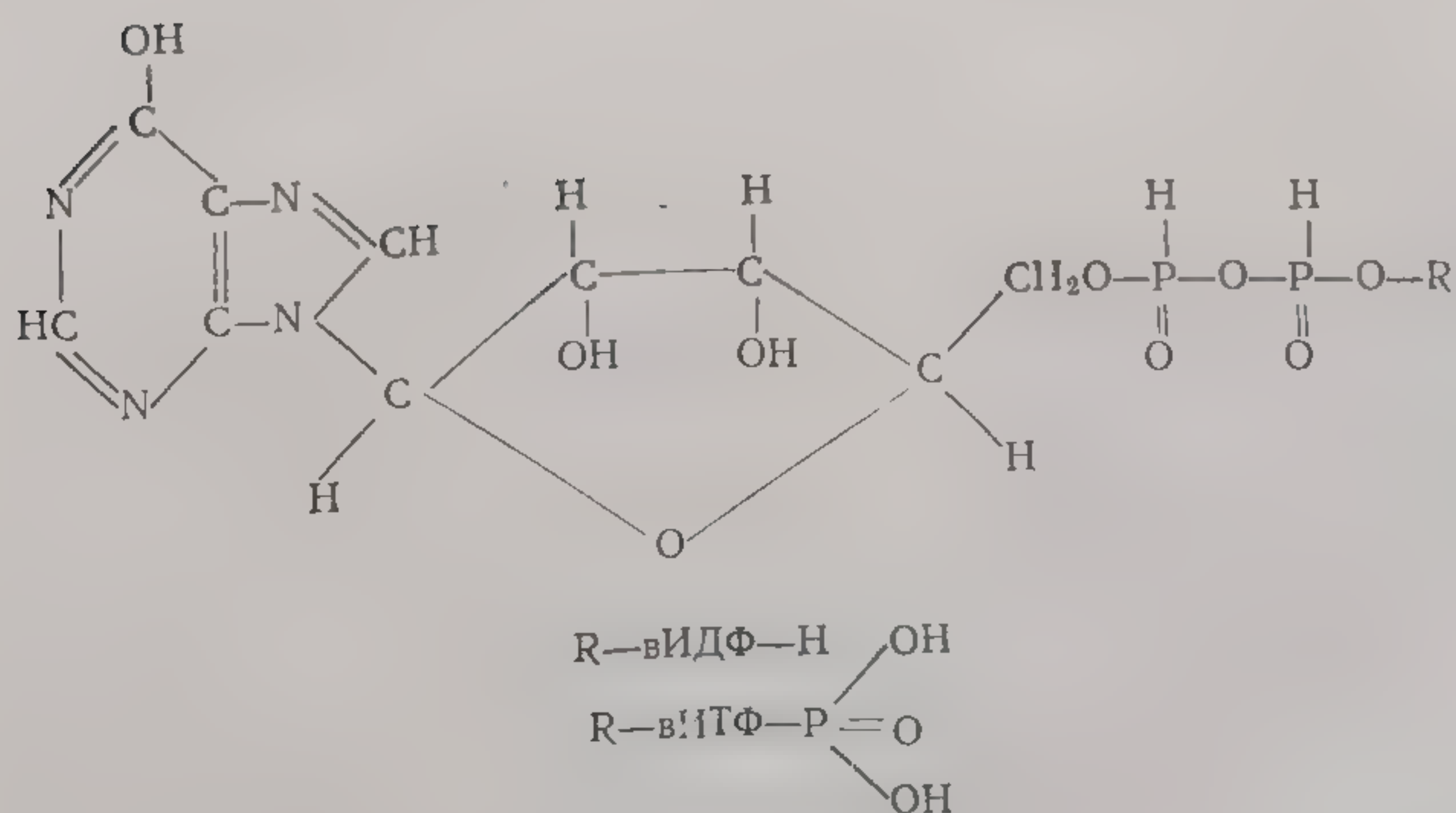
АМФ, АДФ, АТФ — аденозинмоно(ди)(три)фосфат



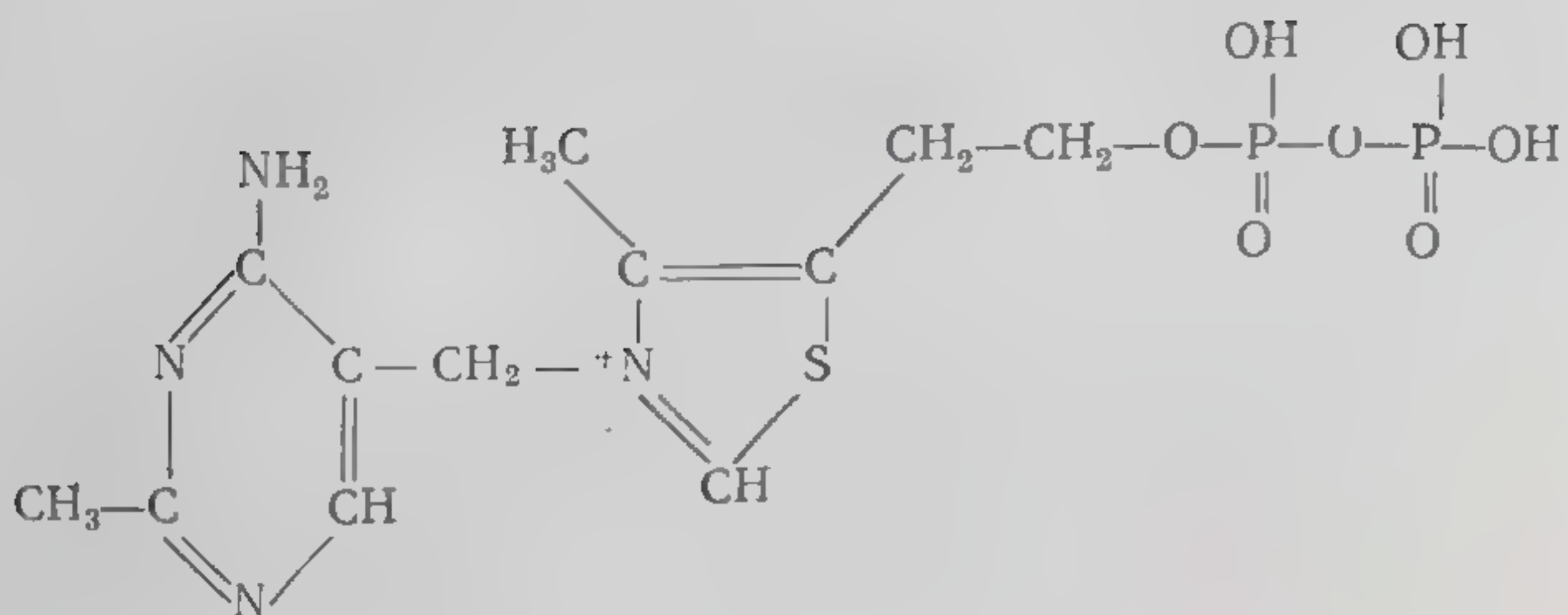
ГДФ и ГТФ — гуанозинди(три)фосфат



ИДФ и ИТФ — инозинди(три)фосфат



ТПФ — тиаминпирофосфат



ДПН — дифосфопиридиндинуклеотид

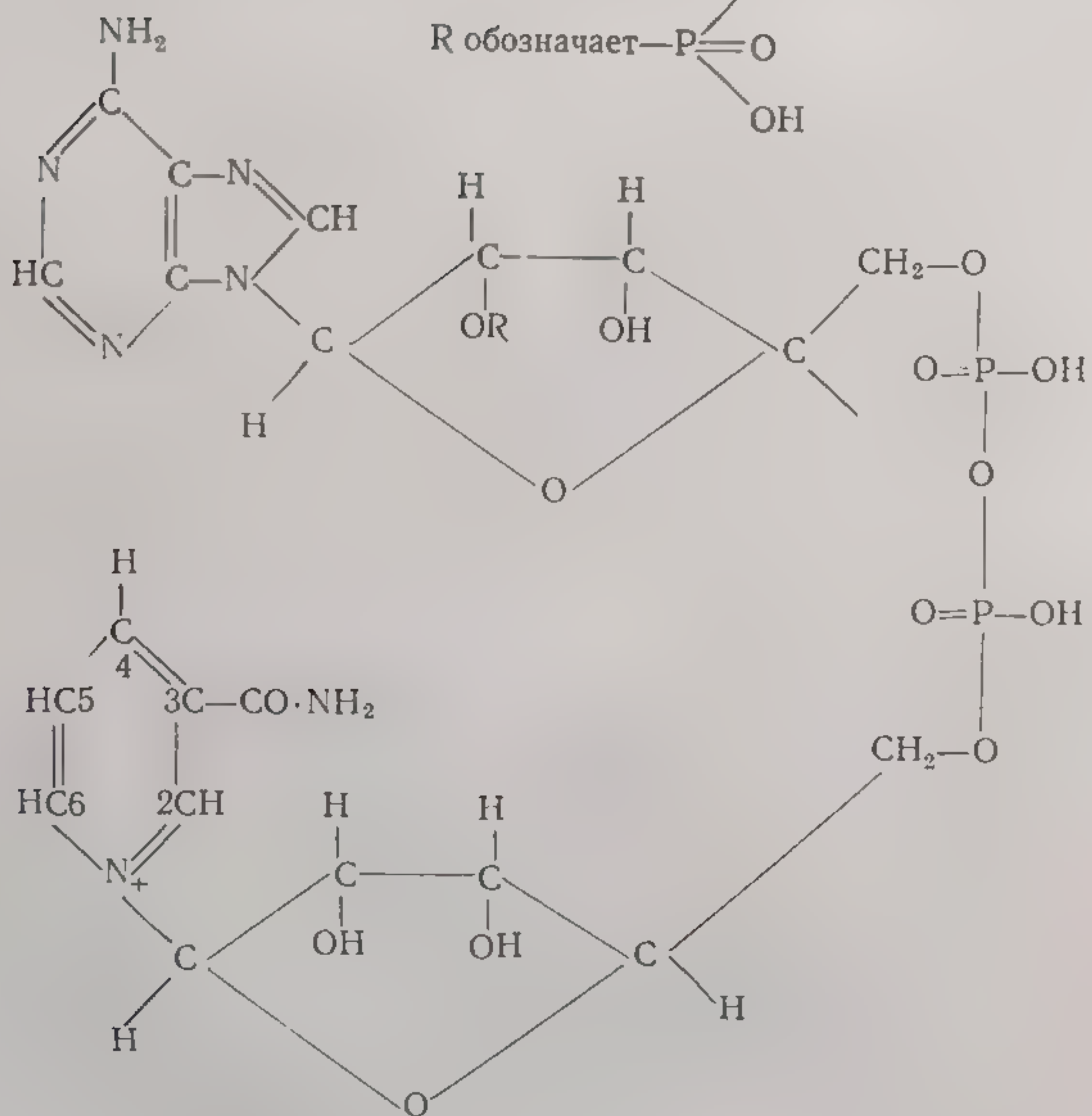
ТПН — трифосфопиридиндинуклеотид

В формуле ДПН:

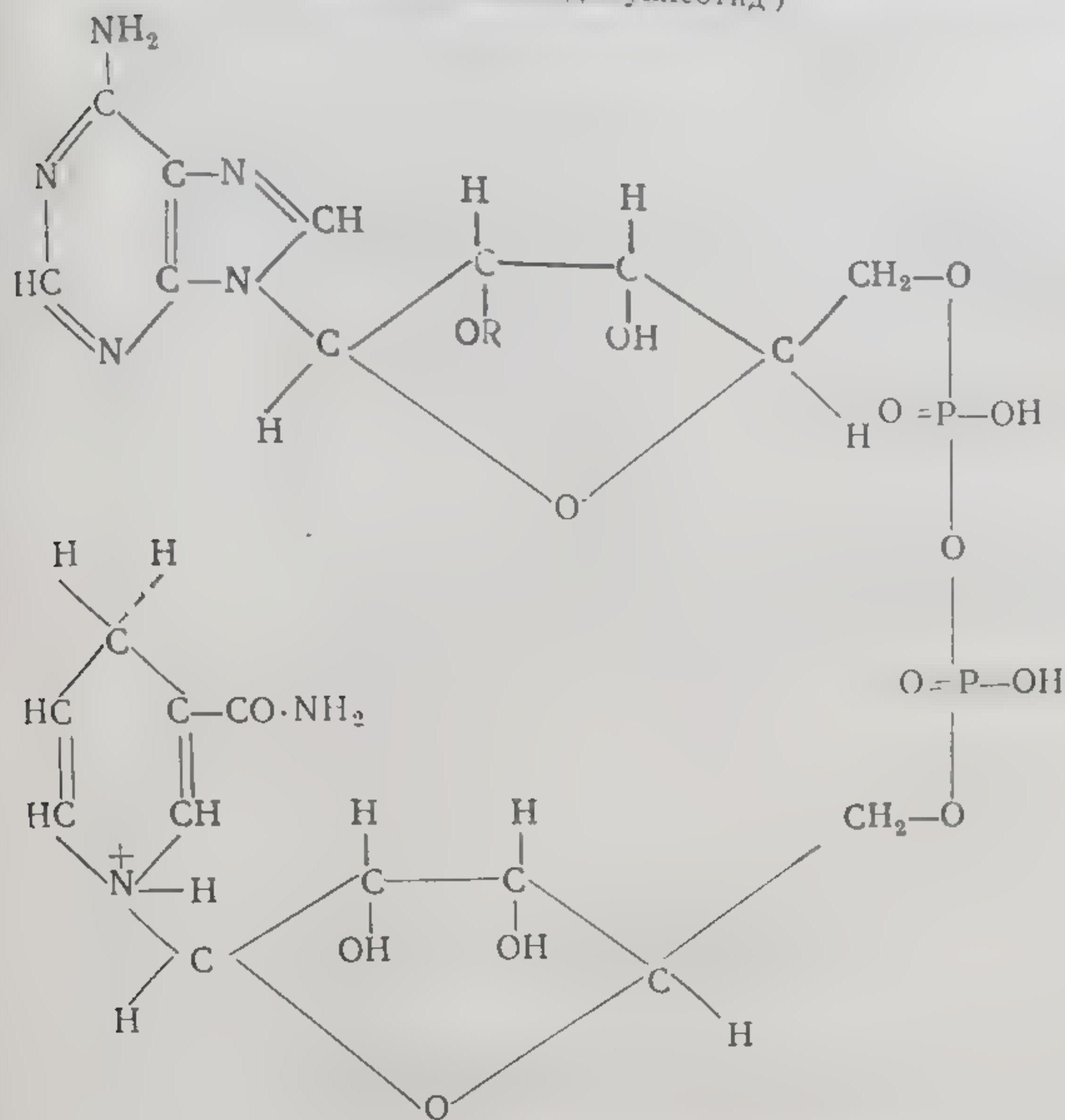
Р обозначает — Н

В формуле ТПН:

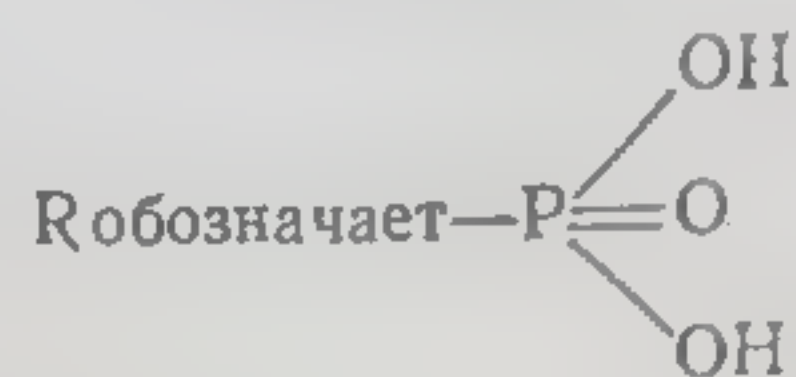
R обозначает $\text{—P} \begin{matrix} \text{OH} \\ \text{=O} \\ \text{OH} \end{matrix}$



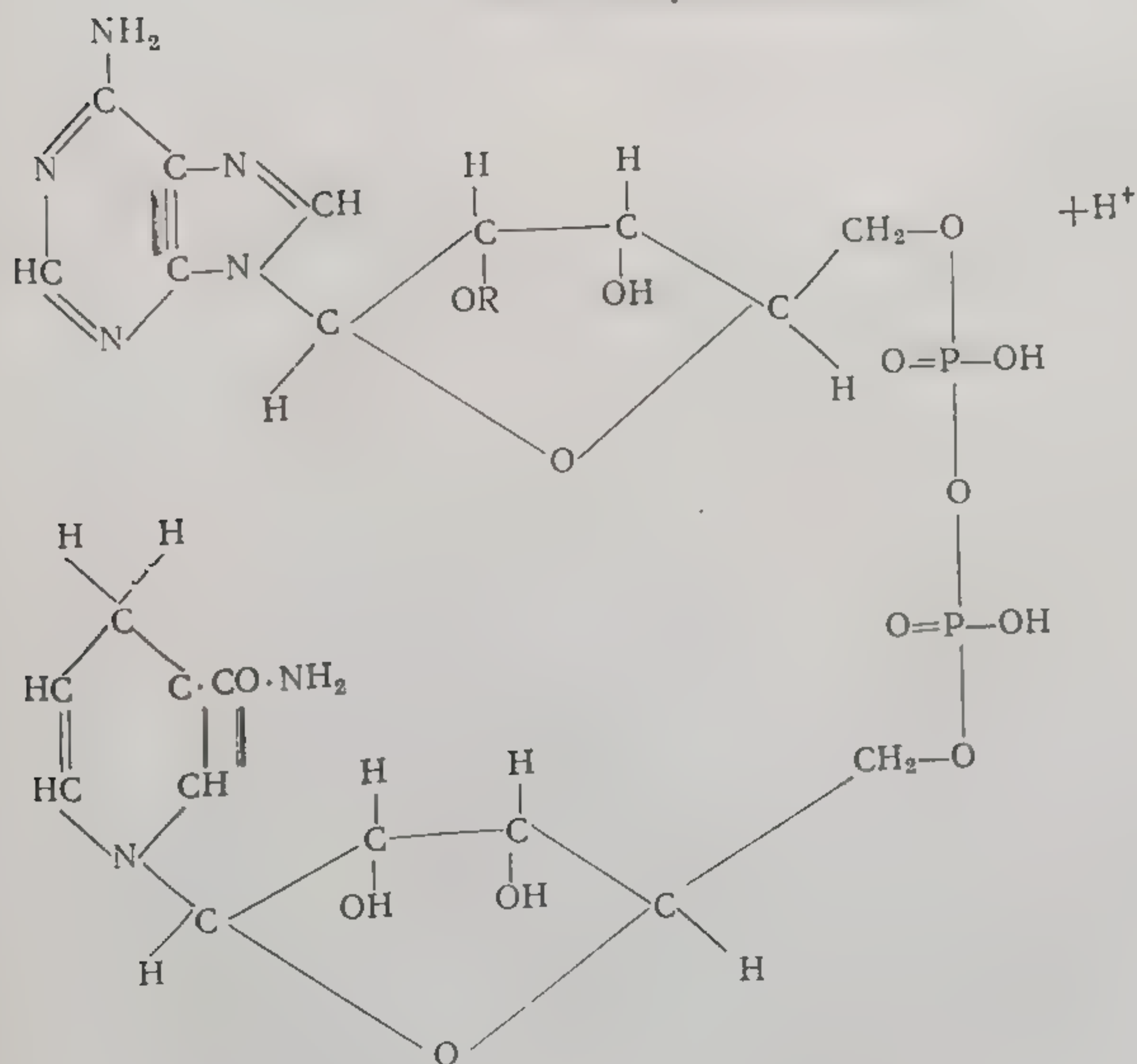
ДПНН — дифосфопиридиндинуклеотид } восстановленные формы
 ТПНН — трифосфопиридиндинуклеотид }



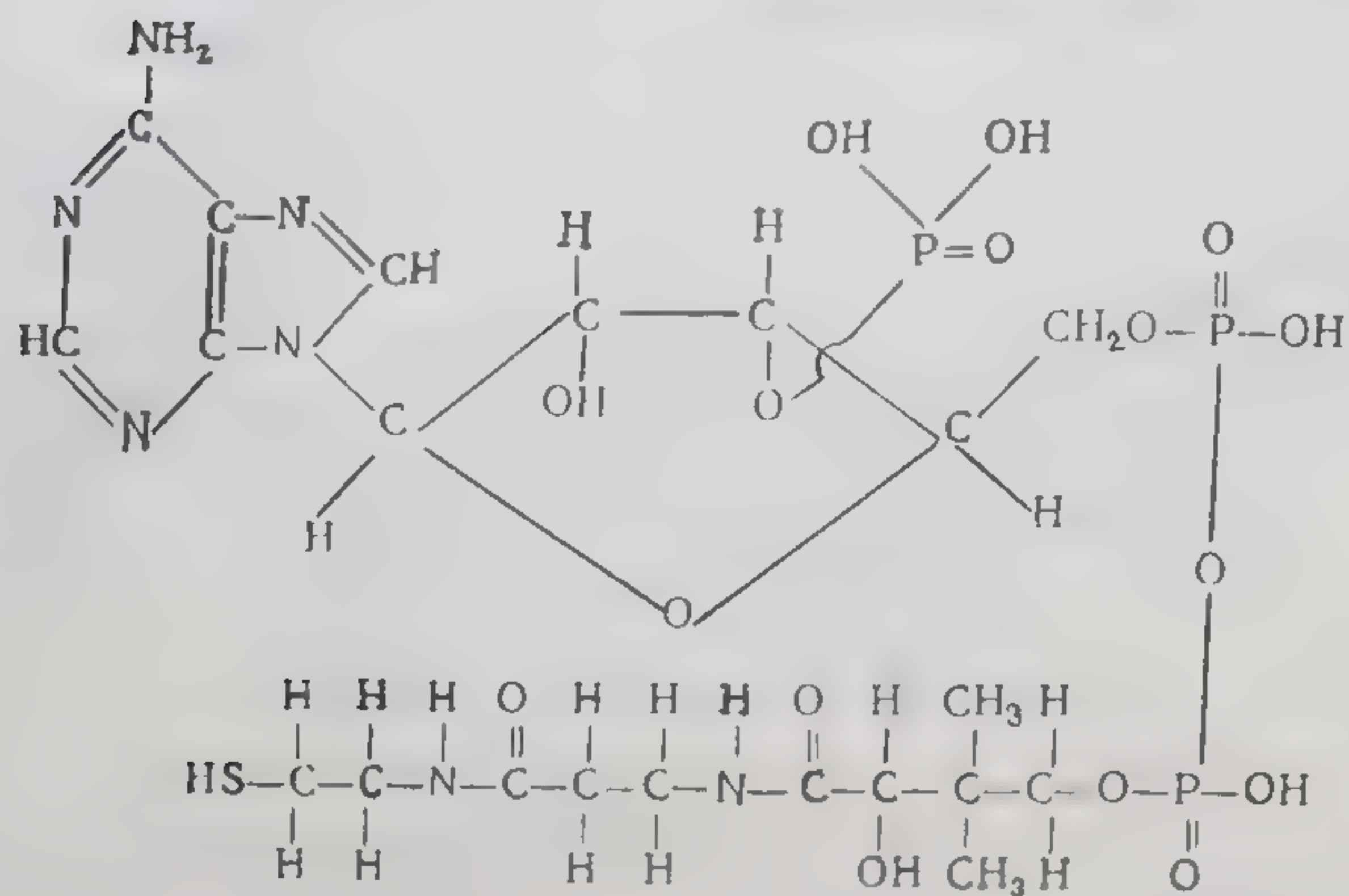
В формуле ДПНН:
 R обозначает — H
 В формуле ТПНН:



или в нейтральном растворе

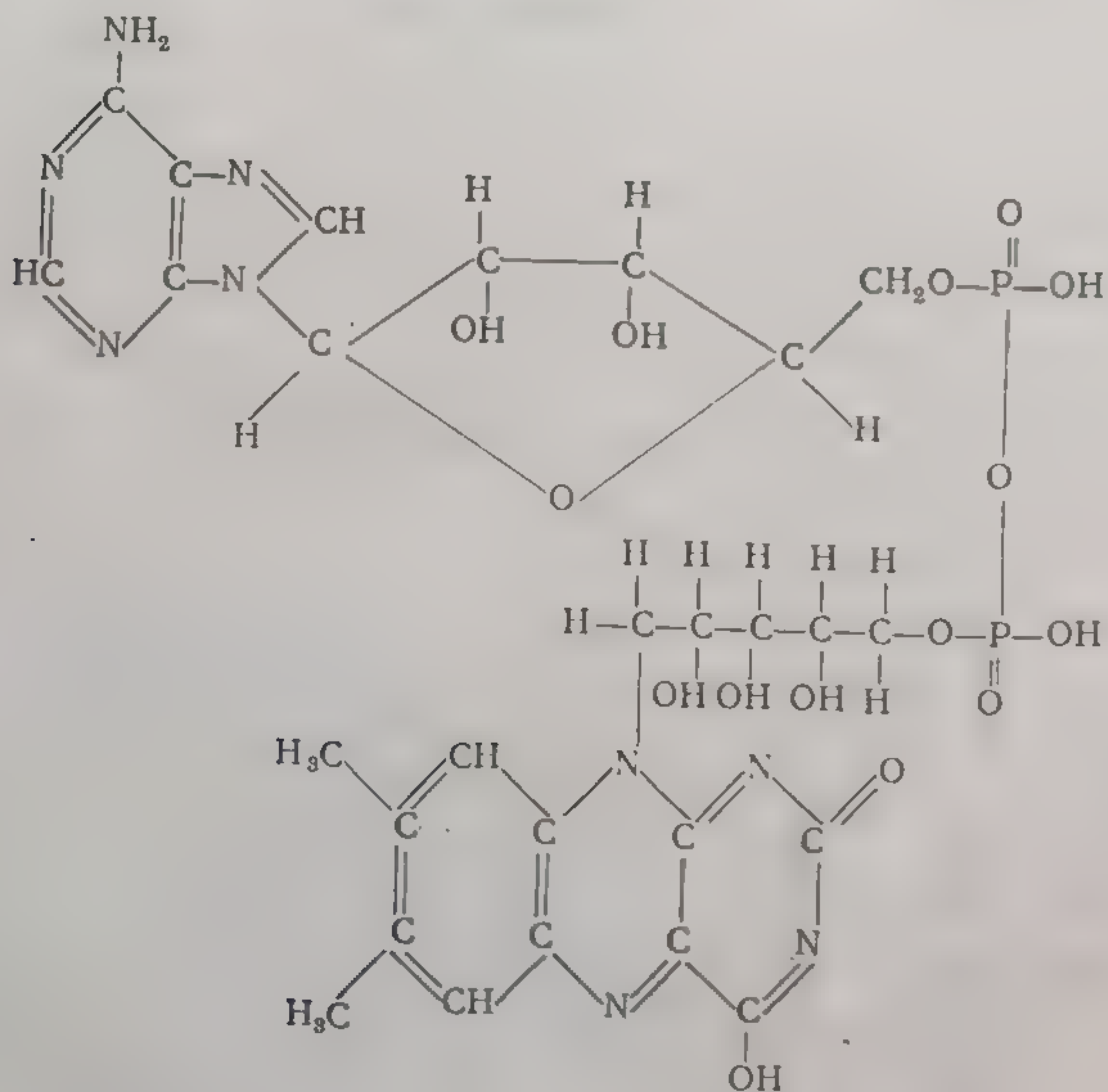


Коэнзим А или коэнзим ацетилирования (КоА)

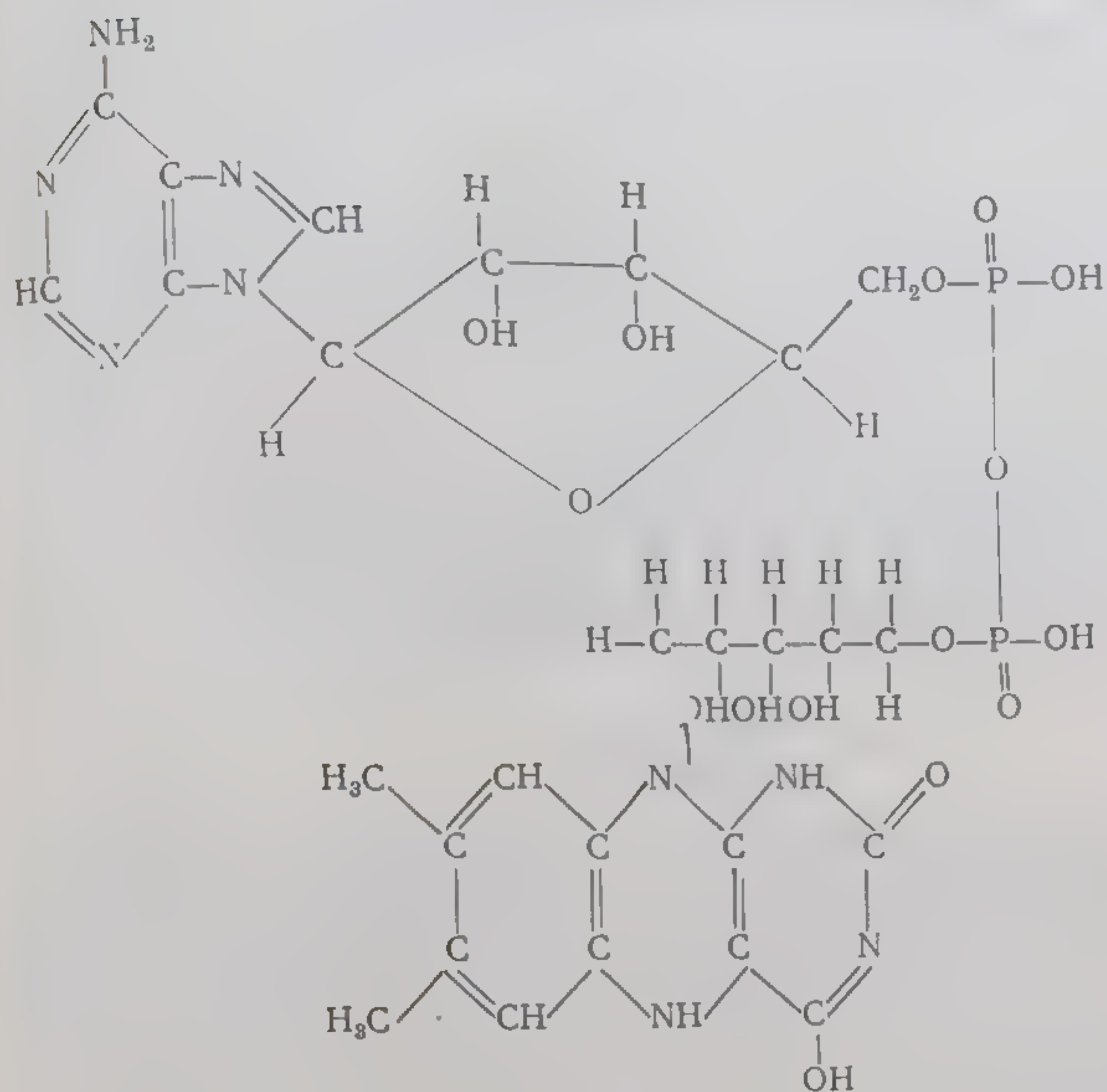


ФлПр — флавопротеид

Простетическая группа одного из флавопротеидов — флавинадениндинуклеотид, окисленная форма



Флавинаденин динуклеотид — восстановленная форма — $\Phi_d\text{P}_p\text{H}_2$



ГЛАВА VIII

ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОМЕЖУТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Л. М. Гинодман

ВВЕДЕНИЕ*

Живая материя функционирует лишь при условии постоянного притока энергии из внешней среды. Источником этой энергии являются питательные вещества. Живая материя использует энергию питательных веществ непосредственно в «химической» форме, а также трансформирует химическую энергию в другие формы — механическую энергию способных к сокращению структур в энергию осмотических процессов, электрическую и лучистую энергию.

Течение процессов обмена веществ в живой материи характеризуется определенными энергетическими показателями. Рассмотрение превращений, происходящих в процессе обмена веществ, под углом зрения их энергетической характеристики позволяет понять причины, обуславливающие течение рассматриваемых промежуточных реакций в данных условиях в определенном направлении, а также предвидеть изменения в ходе реакций при изменении условий их протекания [1—6].

Величина запаса энергии является одной из важнейших характеристик системы. Состояние с большим запасом энергии будет относительно неустойчивым по сравнению с состоянием с меньшим запасом энергии.

На первый взгляд наиболее наглядным показателем освобождения энергии в результате осуществления реакции является выделение теплоты. Следовательно, можно было бы предположить, что экзотермические реакции являются самопроизвольными. Однако факт наличия самопроизвольных эндотермических реакций указывает на неприменимость этого критерия. Наиболее важным показателем энергетической характеристики реакции является величина ее свободной энергии или, точнее, изменение величины свободной энергии системы. Обычно оно обозначается символом ΔG . Эта величина измеряется в калориях на моль и характеризует процесс при условии постоянства температуры T и давления P . В физическом смысле величина ΔG представляет ту часть внутренней энергии системы, претерпевающей изменение, которая может быть превращена в работу при постоянных T и P . Изменяющуюся систему характеризует одновременно и величина так называемой связанной энергии. Это та часть внутренней энергии системы, которая не может быть превращена в работу при постоянных T и P ; она выражается произведением $T\Delta S$, где T — абсолютная температура, ΔS —

* Список сокращений помещен в конце главы.

изменение энтропии — фактора емкости связанной энергии системы при рассматриваемом превращении. Сумма изменений свободной и связанной энергии составляет изменение внутренней энергии системы:

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S. \quad (1)$$

ΔH доступно непосредственному измерению в опыте и соответствует величине теплового эффекта процесса. При рассмотрении величин ΔG и ΔH для химических превращений их относят к 1 молю веществ в так называемых стандартных условиях; для реакций в водных растворах принято считать стандартными следующие условия: концентрации компонентов 1 моль/л, $T=298^\circ\text{K}$ (25°C), $\text{pH } 0$. Для этих условий приняты обозначения ΔG° и ΔH° . В биохимии реакции рассматривают обычно при $\text{pH } 7$. Соответствующую величину свободной энергии обозначим $\Delta G'$. Изменение величины свободной энергии является критерием самопроизвольности реакции. Для самопроизвольных превращений эта величина имеет знак минус, т. е. происходит освобождение свободной энергии. Основная задача при получении энергетической характеристики реакции состоит в определении величины ΔG .

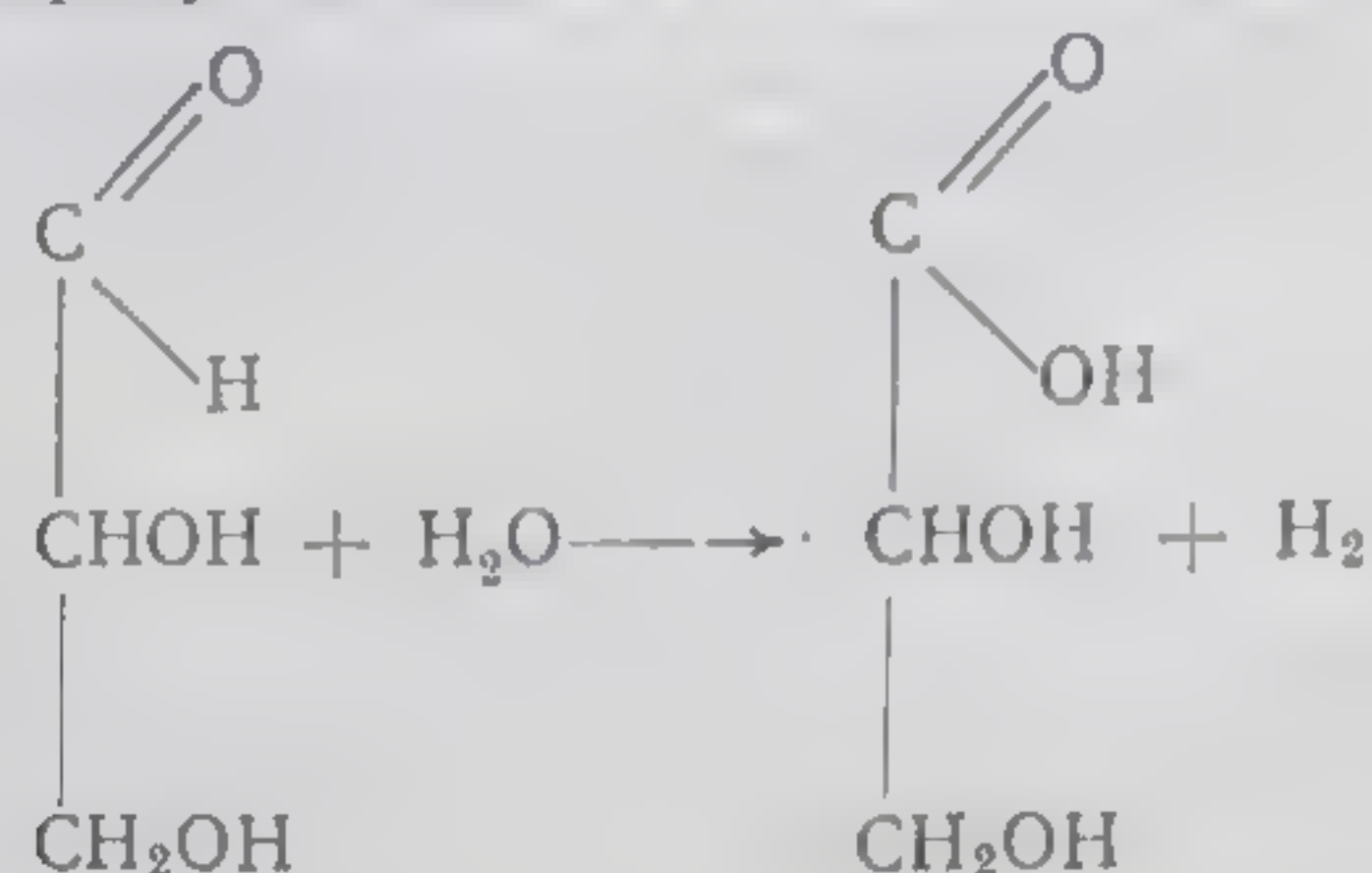
1. Определение величины ΔG

Существует несколько путей определения этой величины. Один из методов состоит в вычислении ΔG по уравнению (1). При этом величина ΔH определяется калориметрическим путем, изменение энтропии ΔS может быть вычислено на основании определений теплоемкостей каждого из участвующих в реакции соединений, начиная от самых низких температур до температуры реакции. Эти определения являются весьма трудоемкими и требуют специальной довольно сложной аппаратуры; величины теплоемкостей должны быть определены с большой точностью. Расчет величины энтропии химического соединения может быть произведен ориентировочно на основании следующих данных: вхождение определенных атомов в состав молекулы рассматриваемого соединения с учетом их различных возможных положений в молекуле влияет на энтропию соединения следующим образом.

$\begin{array}{c} \\ -\text{C}- \\ \end{array}$	— 12,4 единицы энтропии (е э)	
$\text{H}-$	11,3 е э	
$-\text{O}-$	0,9 е э для конечных групп	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \text{ C} \\ \text{O} \parallel \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{O}-\text{H} \quad \text{O}-\text{H} \end{array}$
$-\text{O}-$	4,6 е э для вторичных спиртовых групп	$\begin{array}{c} \\ \text{CH}-\text{O}-\text{H} \\ \end{array}$
$\text{O} =$	24,4 е э	

Для интересующих нас элементов величины энтропий при 298°K имеют значение: для $\text{C} + 1,3$ е э, для $\frac{1}{2}\text{H}_2 + 15,615$ е э, для $\frac{1}{2}\text{O}_2 + 24,52$ е э. Энтропия воды $S_{(\text{H}_2\text{O})} = 16,2$ е э.

В качестве примера рассмотрим вычисление ΔG° для реакции:



Тепловой эффект этой реакции $\Delta H^\circ = +4000$ кал/моль.

Чтобы вычислить с помощью расчетного метода изменение энтропии в результате этой реакции, нет необходимости отдельно вычислять энтропии глицеринового альдегида и глицериновой кислоты; достаточно определить величину разности энтропий этих соединений. Из приведенных выше данных видно, что энтропия глицериновой кислоты отличается от энтропии глицеринового альдегида на весьма незначительную величину — 0,9 еэ, которая обуславливается атомом кислорода в —ОН группе карбоксила кислоты. Следовательно, можно вычислить, что изменение энтропии в результате рассматриваемой реакции составит:

$$\Delta S^\circ = S_{\text{глицериновой кислоты}} + S_{\text{H}_2} - S_{\text{глицеринового альдегида}} - S_{\text{H}_2\text{O}} \\
 0,9 + 2 \times 15,615 - 16,2 = 16 \text{ еэ.}$$

Величина $T\Delta S$ будет равна $298 \times 16 = 4770$ кал.

Найдем ΔG реакции:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = 4000 - 4770 = -770 \text{ кал/моль.}$$

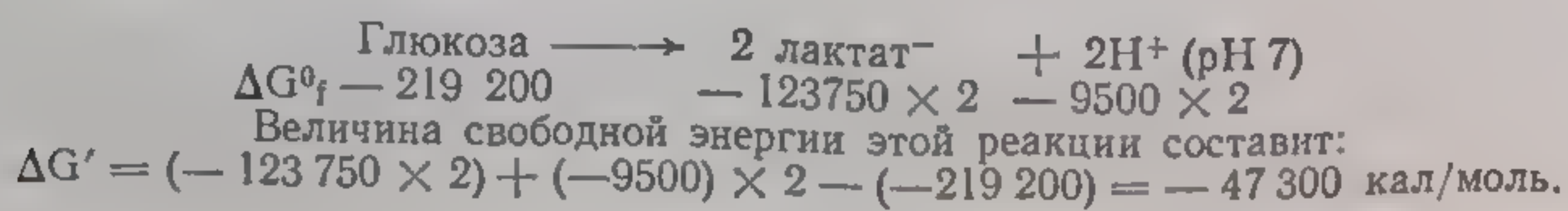
Эта величина рассчитана для pH 0 без учета диссоциации глицериновой кислоты.

Другим путем определения величины ΔG° реакции является расчет по данным свободных энергий образования исходных веществ и конечных продуктов реакции. Величина G_f° — свободная энергия образования вещества — показывает, какое количество энергии выделилось при образовании данного соединения из элементов. Свободные энергии образования элементов в стандартных условиях приняты равными нулю. Величины свободных энергий образования вычислены для большого числа соединений, в том числе и для веществ, представляющих значительный интерес для биохимии. Эти данные приведены в ряде источников [7, 1, 8]. Свободную энергию реакции в стандартных условиях вычисляют путем нахождения разности между суммой ΔG_f° конечных продуктов и суммой ΔG_f° исходных веществ:

$$\Delta G^\circ = \sum \Delta G_f^\circ (\text{конечных продуктов}) - \sum \Delta G_f^\circ (\text{исходных веществ}). \quad (\text{II})$$

Наряду со сводками данных для величин ΔG_f° составлены специальные таблицы, показывающие изменения величины ΔG_f° в зависимости от изменения структуры вещества.

Рассмотрим в качестве примера суммарную реакцию гликолитического процесса при pH 7.



Таким образом, общее количество свободной энергии, которое может освободиться в результате гликолитического процесса, составляет 47 300 кал/моль (глюкозы).

При вычислении свободной энергии реакции по величинам ΔG_i^0 получают величины ΔG^0 , относящиеся к стандартным условиям, при которых для реакций в водных растворах (как отмечалось выше) предусматриваются одномолярные концентрации для исходных и конечных веществ. Концентрация воды принимается равной единице; фактически же в разбавленных водных растворах молярная концентрация воды составляет 55 М. Величина ΔG для реакции, протекающей не в стандартных, а в реальных (например, физиологических) условиях, может весьма существенно отличаться от ΔG^0 .

Величина свободной энергии реакции $A + B \rightleftharpoons C + D$ с учетом фактических концентраций рассчитывается по формуле:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}, \quad (III)$$

где $[A]$ и $[B]$ — концентрации веществ, вступающих в реакцию, $[C]$ и $[D]$ — концентрации конечных продуктов; R — газовая постоянная (1,985 кал/моль). При $T = 25^\circ\text{C}$ (298° K)

$$\Delta G = \Delta G^0 + 1370 RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}. \quad (IIIa)$$

Строго говоря, в приведенной формуле должны были бы использоваться не концентрации, а активности, однако для разбавленных водных растворов величина допускаемой ошибки обычно относительно невелика.

Исходя из приведенного соотношения между величиной ΔG и концентрациями веществ — участников реакции, легко показать соотношение между константой равновесия реакции K и ΔG^0 . В состоянии равновесия способность системы производить работу равна нулю, т. е. $\Delta G = 0$. Таким образом, для одного состояния системы всегда известна величина ΔG , при этом концентрации исходных веществ и конечных продуктов являются равновесными; следовательно, по формуле (III), принимая во внимание, что

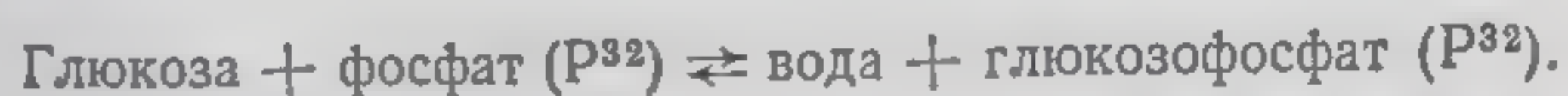
$$\frac{[C]_{\text{равн.}} [D]_{\text{равн.}}}{[A]_{\text{равн.}} [B]_{\text{равн.}}} = K, \quad (IV)$$

$$\begin{aligned} \text{получаем: } 0 &= \Delta G^0 + RT \ln K, \\ \text{откуда: } \Delta G^0 &= -RT \ln K. \end{aligned} \quad (V)$$

Таким образом, если известно ΔG^0 , то K может быть рассчитано по формуле (V). По величине же равновесных концентраций исходных веществ и конечных продуктов реакции может быть определена величина ΔG^0 . Из формулы (III) вытекает также, что при 1 М концентрациях участников реакции величина ΔG равна ΔG^0 .

Расчет величины ΔG^0 по константе равновесия реакции очень часто применяется при энергетической характеристике биохимических реакций. Метод применим в тех случаях, когда равновесие не слишком смещено в одну сторону, так как не всегда легко определить незначительную концентрацию одного из участников реакции в условиях высоких концентраций других участников (концентрации которых могут превышать концентрацию данного вещества в сотни раз и больше). В этом отношении значительные возможности открывает метод радиоактивных индикаторов, позволяющий определить ничтожные количества одного из веществ в присутствии значительного избытка даже близких по свойствам соединений. Этот метод был, в частности, применен для определения положения равновесия при гидролизе эфиров фосфорной кислоты в условиях разбавленных водных

растворов [9]. В наступившем состоянии равновесия легко определимы концентрации фосфата и соответствующего спирта. Равновесную же концентрацию сложного эфира можно определить по радиоактивности. Так, если взять в качестве исходных компонентов радиоактивный фосфат и глюкозу, то в присутствии фермента фосфатазы будет синтезироваться радиоактивный глюкозофосфат, имеющий такой же изотопный состав, как и исходный фосфат:



Радиоактивность синтезированного глюкозофосфата будет пропорциональна его концентрации. Синтезированный меченый глюкозофосфат выделяется из реакционной смеси после добавления носителя — немеченого глюкозофосфата. Повторными отмываниями, состоящими в добавлении немеченого фосфата с последующим его осаждением удастся освободиться от примеси свободного радиоактивного фосфата. Для определения эффективности отмываний и внесения в случае необходимости соответствующих поправок проводятся контрольные анализы, заключающиеся в отмывании носителя, не содержащего, естественно, радиоактивного эфира, от меченого фосфата. Так, в типичном опыте по определению положения равновесия при гидролизе глюкозо-6-фосфата были получены следующие данные:

Конечная концентрация глюкозы — 0,0368 М; фосфата — (активность) 2 950 000 имп/мин; глюкозо-6-фосфата — (активность) 1870 имп/мин.

$$K = \frac{[\text{глюкоза}][\text{фосфат}]}{[\text{глюкозо-6-фосфат}]} = \frac{0,0368 \cdot 2\,950\,000}{1870} \approx 60.$$

При рН = 7 и T = 25°C константа равновесия K ≈ 80.

$$\Delta G' = -RT \ln K = -2600 \text{ кал/моль}.$$

Следует отметить, что при концентрации фосфата, близкой к физиологической (0,005 М), величина ΔG_ф гидролиза будет значительно больше и составит

$$\Delta G_{\text{ф}} = \Delta G' + RT \ln 0,005 = -2600 - 3150 = -5750 \text{ кал/моль}.$$

Для окислительно-восстановительных реакций значение ΔG можно вычислить, исходя из величины электродвижущей силы такого гальванического элемента, источником энергии для которого является рассматриваемая реакция. Участвующие в окислительно-восстановительных реакциях вещества могут находиться либо в окисленной, либо в восстановленной форме. Переход вещества из восстановленной в окисленную форму связан с отдачей электронов другой системе. Мерой способности данной системы служить донором электронов является ее окислительно-восстановительный потенциал. При измерении окислительно-восстановительных потенциалов электродом сравнения служит водородный электрод. Разность потенциалов между полуэлементом, образованным исследуемой окислительно-восстановительной системой, и водородным электродом определяется уравнением:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{окисл.}]}{[\text{восст.}]}, \quad (\text{VI})$$

где [окисл.] и [восст.] — концентрации окисленной и восстановленной форм вещества; F — постоянная величина, константа Фарадея, равная 23 060 кал; n — число электронов, участвующих в реакции; E₀ — потенциал исследуемой системы при равных концентрациях окисленной и восстановленной форм, т. е. «нормальный окислительно-восстановительный потенциал» (при рН 0).

Величину потенциала при значениях рН, отличных от нуля, обозначают E' . В биохимических исследованиях сравнение систем проводят обычно при рН 7,0. Выражение электродного потенциала при рассматриваемом значении рН (E').

$$E' = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{окисл.}]}{[\text{восст.}]} + \frac{RT}{nF} \ln (H^+)^m, \quad (\text{VII})$$

где (H^+) — концентрация водородных ионов, n — число электронов, m — число водородных ионов, участвующих в реакции.

$$\text{Для случая, когда } \frac{[\text{окисл.}]}{[\text{восст.}]} = 1, E' = E_0 - \frac{m}{n} \cdot 0,058 \text{ рН.} \quad (\text{VIIa})$$

Сопоставление окислительно-восстановительных потенциалов различных систем позволяет предсказать направление течения и размер осуществления окислительно-восстановительной реакции. Таблицы окислительно-восстановительных потенциалов для систем, представляющих интерес для биохимии, приведены у Ларди и Кребса [8, 10].

Величина ΔG окислительно-восстановительной реакции определяется по формуле:

$$\Delta G = -nF\Delta E, \quad (\text{VIII})$$

где n — число эквивалентов, ΔE — разность окислительно-восстановительных потенциалов, участвующих в реакции систем.

В качестве примера вычислим величину $\Delta G'$ реакции восстановления кодегидрогеназы при рН 7.



В качестве второго полуэлемента используется водородный электрод при рН 0. По литературным данным, для системы кодегидрогеназы при рН 7 $E = -0,320$ в.

$$\Delta G' = -2 \times 23\,060 (-0,32) = +14\,750 \text{ кал/моль.}$$

Значения ΔG для многих реакций могут быть определены путем рассмотрения исследуемой реакции как суммы других реакций, для которых уже известны величины ΔG . При этом как химические уравнения, так и величины ΔG суммируются с учетом знаков. Именно таким путем были вычислены значения ΔG для ряда важнейших реакций обмена веществ, например реакции гидролиза конечной фосфатной группы в АТФ.

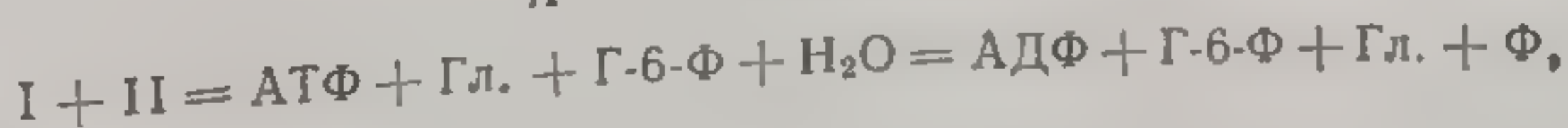
Рассмотрим в качестве примера этот расчет. Представим реакцию гидролиза АТФ как сумму двух реакций: гексокиназной и фосфатазной:



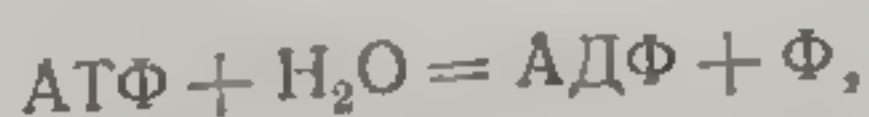
$$\Delta G_1' \approx -4\,000 \text{ кал/моль}^1;$$



$$\Delta G_{II}' = -2600 \text{ кал/моль.}$$



или после сокращения:



$$\Delta G' = \Delta G_1' + \Delta G_{II}' = -4000 + (-2600) = -6600 \text{ кал/моль.}$$

¹ Для $\Delta G'$ гексокиназной реакции взята средняя величина из двух, имеющих в литературе [11].

Еще одним примером комбинирования уравнений может служить гоф (первоначальный вариант расчета содержал ряд ошибок, которые были исправлены (см. [12]).

Реакцию сопряженного с фосфорилированием окисления 3-ФГА можно представить в виде суммы следующих трех реакций:



ΔG гидролиза АТФ будет равна $(-\Delta G_{\text{III}})$, причем $-\Delta G_{\text{III}} = -(\Delta G - \Delta G_{\text{I}} - \Delta G_{\text{II}})$.

Для суммарной реакции известна константа равновесия: при рН 7,8 $K = 3 \cdot 10^3$, следовательно, $\Delta G = -4700$ кал/моль. Величина свободной энергии реакции I ($\Delta G' = -14\,700$ кал/моль при рН 7,0) была рассчитана выше. При переходе к рН 7,8, учитывая, что в реакции участвуют 3 протона и 2 электрона, свободная энергия реакции будет иметь значение $\Delta G = -15\,850$ кал/моль. Расчет свободной энергии реакции II (для нефосфорилированных соединений при рН 0) также был приведен выше, $\Delta G^0 = -770$ кал/моль. Чтобы вычислить величину свободной энергии этой реакции при рН 7,8, необходимо учесть, что образование иона фосfogлицерата при рН 0 (рК 3,42) связано с изменением свободной энергии на величину $\Delta G = +4600$ кал/моль, а переход от рН 0 к рН 7,8 вызывает изменение свободной энергии этой реакции на $\Delta G = -31\,300$ кал/моль.

Тогда $\Delta G_{\text{II}} = -770 + 4600 - 31\,300 = -27\,500$ кал/моль. Подробнее этот расчет см. [12].

Следовательно,

$$\Delta G_{\text{III}} = -(-4700 - 15\,850 + 27\,500) \approx -7000 \text{ кал/моль.}$$

Если учесть различие констант диссоциации 3-ФГА и 3-ФГК, а также рассчитать значение $\Delta G'_{\text{III}}$ для рН 7, то получим величину порядка -8000 кал/моль.

2. Соединения с богатыми энергией связями

Большое число биологически важных соединений, взаимодействуя с водой, могут подвергаться реакции гидролиза; в качестве примеров можно указать на гидролиз АТФ, ацетил-КоА, углеводно-фосфорных эфиров, пептидов, глицеридов, гликозидов. Процесс гидролиза этих соединений является самопроизвольным — он осуществляется с освобождением свободной энергии. Некоторые из этих реакций гидролиза играют исключительно важную роль в обмене веществ; достаточно напомнить об использовании энергии гидролиза АТФ как универсального источника энергии для синтетических процессов, для мышечного сокращения, процессов всасывания, генерации световой и электрической энергии [14].

Энергетическая характеристика реакций гидролиза различных соединений показывает на значительное различие величин $\Delta G'$. По предложению Липманна [15], среди соединений фосфорной кислоты стали различать две группы: соединения с богатыми энергией фосфатными связями и соединения с бедными энергией фосфатными связями. К числу первых относятся соединения, $\Delta G'$ гидролиза которых составляет величину порядка $10\,000$ кал/моль (к числу этих соединений принадлежат АТФ, АДФ, ФПВК). К соединениям с бедными энергией фосфатными связями, для которых ос-

вобождение энергии при гидролизе составляет около 3000 кал/моль, относятся глицерофосфат, глюкозофосфат.

Принцип разделения на соединения с богатыми и бедными энергией связями был распространен и на вещества, не содержащие фосфорной кислоты. Например, соединением с богатой энергией связью является ацетил-КоА, а соединениями с бедными энергией связями — сложные эфиры глицерина и жирных кислот.

Следует отметить возражения, возникающие в связи с использованием термина «богатая энергией связь». В химии энергией связи называют энергию, необходимую для разрыва данной связи, что соответствует количеству энергии, выделяющейся при образовании этой связи. Таким образом, согласно принятой в химии терминологии, чем больше энергия связи, тем связь прочнее. С химической точки зрения связи, называемые в биохимии «богатыми энергией», являются относительно слабыми связями. Имея, однако, в виду эти различия в терминологии, все же можно пользоваться ставшим общепринятым в биохимии термином «богатая энергией связь». В плане химического строения соединения с богатыми энергией связями представляют собой ангидриды фосфорной кислоты (АТФ, АДФ), смешанные ангидриды карбоксильных кислот и фосфорной кислоты (ацетил-фосфат), тиоэфиры (ацетил-КоА), энолфосфаты (фосфопировиноградная кислота).

До настоящего времени еще не была непосредственно определена константа равновесия при гидролизе соединений с богатыми энергией связями, так как равновесие очень сильно смещено в сторону гидролиза. Однако величину $\Delta G'$ гидролиза богатой энергией связи можно вычислить, как было показано выше, методом комбинирования уравнений.

Положение равновесия реакций, в результате которых за счет одних соединений с богатыми энергией связями образуются другие соединения, также содержащие богатые энергией связи, обычно не смещено резко в одну сторону и может быть относительно легко определено. Можно, в частности, указать на реакцию:



свободная энергия которой составляет $\Delta G = +1000$ кал/моль.

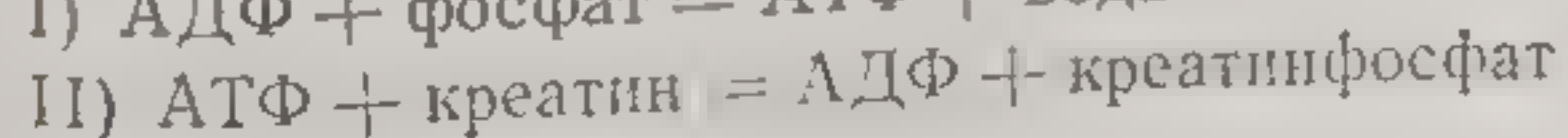
Таким образом, определив величину ΔG гидролиза для одного из соединений с богатой энергией связью, можно затем на основании данных по положению равновесия соответствующих реакций вычислить значения ΔG гидролиза для других соединений с богатыми энергией связями.

В качестве примера определим ΔG гидролиза креатинфосфата, приняв во внимание величину ΔG для реакции между АТФ и креатином.

Суммируя реакции:

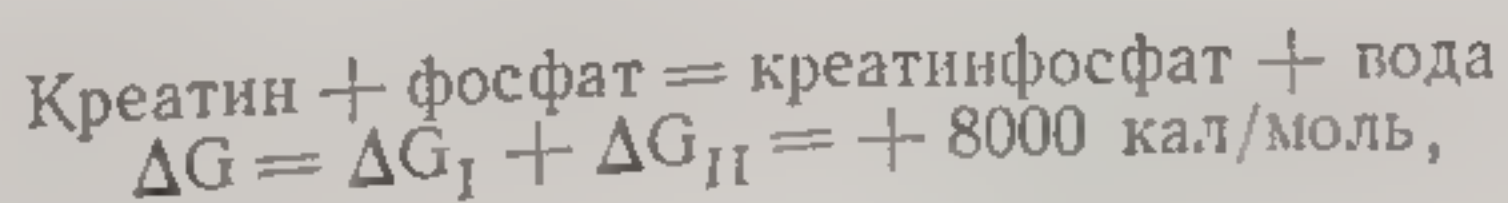


$$\Delta G_I = +7000 \text{ кал/моль};$$



$$\Delta G_{II} = +1000 \text{ кал/моль},$$

найдем, что для реакции:



$$\Delta G = \Delta G_I + \Delta G_{II} = +8000 \text{ кал/моль},$$

а для реакции гидролиза креатинфосфата

$$\Delta G = -8000 \text{ кал/моль}.$$

Следует помнить, что приведенные выше величины ΔG гидролиза богатых и бедных энергией связей относятся к 1 М концентрациям. При фи-

физиологических концентрациях рассматриваемых веществ, т. е. наблюдаемых в живых организмах, величина ΔG может значительно изменяться. Так, например, ΔG_{Φ} для гидролиза АТФ при концентрации фосфата, равной 0,005 М, и величине отношения концентраций $\frac{[АТФ]}{[АДФ]} = 1$ составит:

$$\Delta G_{\Phi} = \Delta G' + RT \ln \frac{[\text{фосфат}] [АДФ]}{[\text{вода}] [АТФ]} = -7000 + 1370 \ln \frac{0,005}{1} = -10\,500 \text{ кал/моль.}$$

Таким образом, величина свободной энергии гидролиза богатой энергией фосфатной связи в физиологических условиях имеет значение около — 10 000 кал/моль. Величина свободной энергии гидролиза «бедной энергией связи», например в Г-6-Ф, в условиях физиологических концентраций приближается к величине свободной энергии гидролиза богатой энергией связи в стандартных условиях. В связи с этим следует отметить, что обращение гидролитических реакций в присутствии соответствующих ферментов в условиях физиологических концентраций практически не имеет места. Так, например, при концентрации фосфата 0,005 М и глюкозы 0,005 М равновесную концентрацию Г-6-Ф вычислим по уравнению:

$$\Delta G = 0 = 2600 + RT \ln \frac{x}{(0,005)^2};$$

$$2600 + 1370 \lg x + 1370 \times 4,6 = 0,$$

$$(Г-6-Ф) = x = 3 \cdot 10^{-6} \text{ М,}$$

т. е. равновесная концентрация Г-6-Ф будет приблизительно в 1000 раз меньше его физиологической концентрации.

На основании литературных данных, а также расчетов, проведенных по принципу суммирования уравнений, мы составили приводимую ниже таблицу величин свободных энергий гидролиза ряда соединений с различными по «запасу энергии» связями в условиях 1 М концентраций при рН 7,0. В некоторых случаях (если можно было найти указания на величины концентраций соответствующих веществ в организме) приведены также величины ΔG_{Φ} для физиологических концентраций.

Таблица 1

ΔG гидролиза некоторых соединений с богатыми и бедными энергией связями

Реакция гидролиза	$\Delta G'$	ΔG_{Φ}
АТФ + Н ₂ О = АДФ + Ф	— 7 000	— 10 000
АДФ + Н ₂ О = АМФ + Ф	— 6 500	— 10 000
ФФФ + Н ₂ О = ФФ + Ф	— 5 500	
ФФ + Н ₂ О = Ф + Ф	— 5 500	— 10 000
АТФ + Н ₂ О = АМФ + ФФ	— 8 500	(— 12 000)
ФПВК + Н ₂ О = ПВК + Ф	— 11 500	— 16 000
1,3 ДФГК + Н ₂ О = 3-ФГК + Ф	— 12 000	— 10 000
Ацетилфосфат + Н ₂ О = ацетат + Ф	— 10 000	
Креатинфосфат + Н ₂ О = креатин + Ф	— 8 000	
Ацетил-КоА + Н ₂ О = ацетат + КоА	— 7 000	
СН ₃ СО СН ₂ СООН + Н ₂ О = 2СН ₃ СООН	— 12 000	
У-ДФГл. + Н ₂ О = УДФ + Гл.	— 5 500	
Ацетилимидазол + Н ₂ О = имидазол + ацетат	— 13 000	
Г-1-Ф + Н ₂ О = Гл. + Ф	— 4 300	
Сахароза + Н ₂ О = Гл. + фруктоза	— 6 000	
Г-6-Ф + Н ₂ О = Гл. + Ф	— 2 600	— 5 700
Глиц. Ф + Н ₂ О = Глиц. + Ф	— 2 100	

3. Энергетическое сопряжение реакций

В связи с положением о том, что самопроизвольно протекают лишь экзоэргонические реакции, т. е. реакции, идущие с освобождением свободной энергии, встает вопрос, каким образом можно представить осуществление в организме большого числа биосинтетических реакций (синтез белков, жиров, углеводов), в результате которых образуются вещества с более высоким запасом энергии, чем исходные вещества. Нет ли здесь противоречия? В действительности указанные выше биосинтетические реакции не могут протекать и не протекают изолированно. Более того, в присутствии соответствующих ферментов соединения с более высоким содержанием энергии самопроизвольно гидролизуются до соединений с относительно меньшим запасом энергии. Биосинтетические процессы (осуществление которых связано с потреблением энергии) протекают в результате сопряжения с экзоэргоническими реакциями, а именно с реакциями расщепления богатых энергией связей. Богатые энергией связи являются аккумуляторами химической энергии, используемой в дальнейшем для биосинтетических реакций, а также для осуществления различных функций организмов.

Энергия химической связи передается от одного процесса к другому только единственным способом, а именно путем образования соединения, общего для обеих осуществляющихся реакций. Суммарный процесс (например, биосинтез полисахарида) оказывается экзоэргоническим при учете энергии, освобождаемой в результате расщепления богатой энергией связи. Подчеркнем также, что каждая стадия сложного биосинтетического процесса является с точки зрения энергетики самопроизвольной в реальных условиях ее осуществления. В природе не могут протекать эндоэргонические процессы. Сопряжение эндоэргонических и экзоэргонических реакций осуществляется таким образом, что ни одна из промежуточных стадий суммарного процесса также не представляет собой эндоэргонической реакции.

Рассмотрим примеры сопряжения реакций. В ряде случаев на одно из соединений, участвующих в эндоэргонической реакции, переносится остаток фосфата; при этом для вновь образовавшегося соединения превращение, бывшее ранее эндоэргоническим, становится экзоэргоническим, если оно осуществляется с отщеплением фосфата. Другой путь сопряжения имеет место в том случае, когда в результате реакции, «поставляющей энергию», значительно увеличивается концентрация исходного вещества или уменьшается концентрация продукта рассматриваемой реакции. Иными словами, если данная реакция в стандартном состоянии имеет положительное $\Delta G'$, то благодаря протеканию сопряженной реакции и изменению концентрации исходных веществ или продуктов ΔG в реальных условиях осуществления реакции становится отрицательным.

Рассмотрим подобный случай на примере превращения:



Однако при величине отношения концентраций $\frac{[\Gamma\text{-1-Ф}]}{[\Gamma\text{-6-Ф}]} = \frac{1}{100}$

$$\Delta G = \Delta G' + RT \ln \frac{1}{100} = +1700 - 2740 = -1000 \text{ кал/моль.}$$

Таким образом, если в результате «поставляющей энергию» реакции образуется $\Gamma\text{-6-Ф}$ и концентрация его превысит примерно в 100 раз концентрацию $\Gamma\text{-1-Ф}$, то реакция $\Gamma\text{-6-Ф} \rightleftharpoons \Gamma\text{-1-Ф}$ пойдет в направлении образования последнего.

Рассмотрим другой случай сопряжения. Синтез гликогена из глюкозы — эндоэргонический процесс, характеризующийся $\Delta G = +5000$ кал/моль (для удлинения цепи на 1 глюкозную единицу).



$$\Delta G = +5000 \text{ кал/моль.}$$

Такая реакция изолированно протекать не может. Фактически имеет место следующая цепочка реакций:

		ΔG	ΔG реалн.
I)	Глюкоза + АТФ \rightarrow Г-6-Ф + АДФ	-4000	-1000
II)	Г-6-Ф \rightarrow Г-1-Ф (100) : (1)	+1700	-1000
III)	$[\text{Гликоген}]_n + \text{Г-1-Ф} \rightarrow [\text{Гликоген}]_{n+1} + \text{Ф}$		200--100
I + II + III $(\text{Гликоген})_n + \text{Глюкоза} + \text{АТФ} \rightarrow$ $\rightarrow (\text{Гликоген})_{n+1} + \text{АДФ} + \text{Ф}$		-2100	-2100

В условиях 1 М концентраций суммарная реакция является экзоэргонической, однако реакции II и III в этих условиях являются эндоэргоническими. В реально же складывающихся условиях (накопление Г-6-Ф в результате сильно экзоэргонической реакции I) реакции II и III также будут экзоэргоническими и процесс согласованно осуществляется в направлении синтеза гликогена.

На приведенных примерах мы еще раз убедились, что реакции эндоэргонические в условиях 1 М концентраций становятся экзоэргоническими в условиях реально складывающихся концентраций. Учет этого обстоятельства особенно важен при энергетической характеристике комплексов биохимических реакций, например гликолиза, к рассмотрению которого мы и переходим.

4. Энергетическая характеристика процесса гликолиза

Гликолитические или сходные по характеру превращений процессы являются, по-видимому, главными источниками энергии для существования многих анаэробных форм живых существ. Эти процессы занимают также одно из центральных мест в углеводном обмене у высокоорганизованных животных, наиболее отчетливо проявляясь при мышечной деятельности. Имеющиеся термодинамические данные, в частности данные по положению равновесий соответствующих реакций, позволяют дать энергетическую характеристику процесса гликолиза в целом, а также его отдельным промежуточным этапам [2,13].

Суммарная реакция гликолиза (рассмотренная выше)



характеризуется при pH 7 величиной $\Delta G' = -47\,300$ кал/моль.

В настоящее время для 10 из 11 промежуточных реакций гликолиза определены положения равновесия, что позволяет вычислить для этих реакций значения величин ΔG . Эти данные, а также величины тепловых эффектов реакций приведены в табл. 2.

Величины свободных энергий $\Delta G'$ и тепловых эффектов ΔH промежуточных реакций гликолиза См. [12]

Таблица 2

№ п/п	Промежуточная реакция	$\Delta G'$ T-25°C pH 7 кал/моль	ΔH кал/моль
1	Гл. + АТФ \rightleftharpoons Г-6-Ф + АДФ		
2	Г-6-Ф \rightleftharpoons Ф-6-Ф	- 4 000	- 4 000
3	Ф-6-Ф + АТФ \rightleftharpoons ФДФ + АДФ	+ 450	+ 500
4	ФДФ \rightleftharpoons 3-ФГА + ФДА	- 4 000	- 4 000
5	ФДА \rightleftharpoons 3-ФГА	+ 5 850	+ 13 000
6	3-ФГА + Ф + Ко \rightleftharpoons 1,3-ДФГК + КоН + Н ⁺	+ 1 900	+ 1 800
7	1,3-ДФГК + АДФ \rightleftharpoons 3-ФГК + АТФ	+ 100	0
8	3-ФГК \rightleftharpoons 2-ФГК	- 4 900	+ 4 000
9	2-ФГК \rightleftharpoons ФПВК	+ 1 000	+ 1 000
10	ФПВК + АДФ \rightleftharpoons ПВК + АТФ	- 600	+ 1 300
11	ПВК + КоН \rightleftharpoons Лактат + Ко	- 4 400	+ 3 500
	1+2+3+4+5+2 (6+7+8+9+10+11)	- 6 000	- 18 000
	Гл. + 2 АДФ + 2 Ф = 2 Лактат ⁻ + 2 Н ⁺ + 2 Н ₂ О + 2 АТФ	- 29 500	- 9 000
	2 АТФ + 2 Н ₂ О = 2 АДФ + 2 Ф	- 14 000	- 10 000

Однако содержащаяся в таблице характеристика является недостаточной. Полная энергетическая характеристика гликолиза предполагает определение величин $\Delta G'$ в условиях физиологических концентраций промежуточных продуктов.

Данные табл. 2 показывают, что в условиях 1 М концентраций компонентов величины $\Delta G'$ одних промежуточных реакций являются отрицательными, а других — положительными. Следовательно, в этих условиях одни реакции протекают в направлении поступательного хода гликолиза, тогда как другие в это же время идут в противоположном направлении. Такое состояние можно охарактеризовать как хаотическое. При реальном осуществлении гликолитического процесса все промежуточные реакции согласованно идут в направлении образования молочной кислоты. Очевидно, такое согласование осуществляется в условиях определенных физиологических концентраций. Совершенно ясно также, что физиологические концентрации различных компонентов не могут принимать произвольных значений, величины их являются в известной мере взаимосвязанными.

В табл. 3 приведены близкие к физиологическим концентрации исходных, промежуточных и конечных продуктов гликолиза, а также отношение концентраций соответствующих форм коферментов гликолиза — адениловой и кодегидрогеназной систем.

Приведенные в табл. 3 величины физиологических концентраций могут, конечно, значительно изменяться. Так, например, при мышечной деятельности может увеличиваться концентрация молочной кислоты, увеличиваются при этом также концентрации гексозофосфатов, триозофосфатов, фосфопировиноградной кислоты. В литературе мы не встретили данных о содержании в тканях 1,3-ДФГК и о величинах отношений концен-

траций $\frac{[3-ФГА]}{[ФДА]}$ и $\frac{[3-ФГК]}{[2-ФГК]}$.

В таблице приведены такие концентрации 1,3-ДФГК, 3-ФГА, ФДА, 3-ФГК и 2-ФГК, которые по крайней мере не препятствуют возможности поступательного хода процесса гликолиза. На основании этих величин концентраций промежуточных продуктов по формуле (III) были вычислены значения ΔG_f для промежуточных реакций гликолиза в физиологических условиях. Эти данные приведены в табл. 4.

При сопоставлении величин свободных энергий промежуточных реакций гликолиза в условиях 1 М и физиологических концентраций видно их

Таблица 3

Приближенные значения физиологических концентраций исходных, промежуточных и конечных продуктов гликолиза

Вещество	Концентрация моль/литр
Глюкоза	0,005
Фосфат	0,005
Глюкозо-6-фосфат	0,005
Фруктозо-6-фосфат	0,001
Фруктозо-1,6-дифосфат	0,002
Фосфодиоксиацетон	0,001
3-фосфоглицериновый альдегид	0,00004
1,3-дифосфоглицериновая кислота	$8 \cdot 10^{-7}$
3-фосфоглицериновая кислота	0,002
2-фосфоглицериновая кислота	0,0004
Фосфопировиноградная кислота	0,001
Пировиноградная кислота	0,0001
Молочная кислота	0,001
[АТФ]	1
[АДФ]	1
[КоН]	1
[Ко]	2

значительное различие. В то время как в условиях 1 М концентраций реакции (2), (4), (5), (8) характеризуются положительными значениями величин $\Delta G'$ в условиях физиологических концентраций все реакции характеризуются отрицательными или нулевыми значениями величин ΔG_f . Следует напомнить, что если величина ΔG какой-либо из промежуточных реакций станет положительной в силу соотношения величин концентраций конечных и исходных продуктов, то эта реакция пойдет в направлении образования исходных продуктов из конечных. В условиях приведенных физиологических концентраций на каждом из промежуточных этапов гликолиза реакции текут в направлении образования молочной кислоты.

Энергетическая характеристика гликолиза схематически изображена на рис. 1.

Таблица 4

Величины свободных энергий ΔG_f промежуточных реакций гликолиза в физиологических условиях ($T = 37^\circ\text{C}$, $pH 7,4$, физиологические концентрации)

№ п/п	Промежуточная реакция	ΔG_f кал/моль
1	Гл. + АТФ \rightleftharpoons Г-6-Ф + АДФ	-4 000
2	Г-6-Ф \rightleftharpoons Ф-6-Ф	- 550
3	Ф-6-Ф + АТФ \rightleftharpoons ФДФ + АДФ	-4 000
4	ФДФ \rightleftharpoons 3-ФГА + ФДА	- 500
5	ФДА \rightleftharpoons 3-ФГА	0
6	3-ФГА + Ф + Ко \rightleftharpoons 1,3-ДФГК + КоН + Н ⁺	0
7	1,3-ДФГК + АДФ \rightleftharpoons 3-ФГК + АТФ	0
8	3-ФГК \rightleftharpoons 2-ФГК	0
9	2-ФГК \rightleftharpoons ФПВК	- 350
10	ФПВК + АДФ \rightleftharpoons ПВК + АТФ	-6 000
11	ПВК + КоН \rightleftharpoons лактат + Ко	-3 000
	1+2+3+4+5+2 (6+7+8+9+10+11) Гл. + 2 АДФ + Ф = 2 лактат ⁻ + 2Н ⁺ + + 2 Н ₂ О + 2 АТФ	-28 000
	2 АТФ + 2 Н ₂ О = 2 АДФ + 2 Ф	-20 000

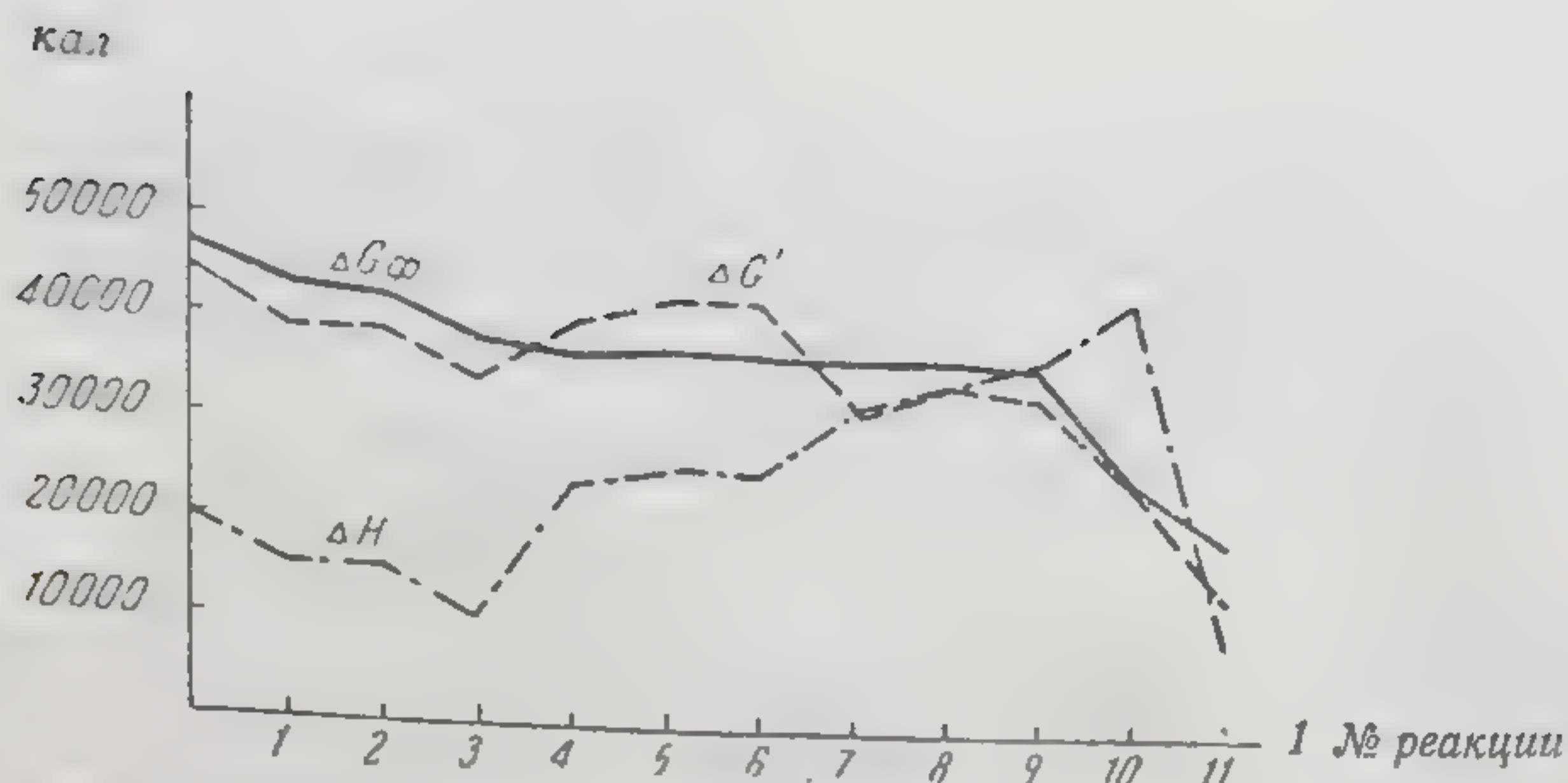


Рис. 1. Энергетическая характеристика промежуточных реакций гликолиза.

На приведенной схеме верхний уровень энергии соответствует уровню энергии глюкозы, нижний — лактата. Пунктирной линией обозначены изменения свободной энергии по этапам гликолиза в условиях 1 М концентраций; на тех участках, где кривая поднимается вверх, величина ΔG положительна, и реакция самопроизвольно течет в направлении, обратном поступательному ходу гликолиза. Сплошной линией обозначено изменение свободной энергии по этапам гликолиза в условиях физиологических концентраций. Эта кривая нигде не имеет подъема. На всех этапах возможен поступательный ход процесса в направлении образования молочной кислоты. Штрих-пунктиром обозначено изменение теплосодержания. Следует отметить, что, за исключением термонеutralной реакции 6, реакции с 4 по 10 включительно являются эндотермическими. Только на этапе реакции 11 выделяется значительное количество тепла. Очевидно, что на основе тепловых эффектов реакций, которыми раньше нередко пользовались в биохимической литературе, нельзя составить правильного представления о направлении промежуточных реакций гликолиза.

В результате осуществления процесса гликолиза в условиях приведенных выше физиологических концентраций исходных и конечных продуктов освобождается $\Delta G = -28\,000$ кал свободной энергии на 1 моль глюкозы. Эта энергия рассеивается в форме тепла и является мерой необратимости процесса гликолиза. Одновременно $\Delta G \approx -20\,000$ кал свободной энергии (на 1 моль глюкозы) накапливаются в двух богатых энергией фосфатных связях АТФ. Коэффициент полезного действия процесса гликолиза составляет, следовательно,

$$\frac{20\,000}{20\,000 + 28\,000} \approx 40\%.$$

На основании данных по энергетической характеристике процесса гликолиза и величины $\Delta G'$ гидролиза бедной энергией фосфатной связи в гексофосфате может быть рассчитана величина свободной энергии гидролиза богатой энергией фосфатной связи в АТФ.

Представим процесс превращения глюкозы в лактат как сумму одиннадцати реакций, девять из которых представляют собой промежуточные реакции гликолиза (см. табл. 2 реакции 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Две другие реакции это (1)' — синтез Г-6-Ф из глюкозы и свободного фосфата (вместо гексокиназной реакции) и (3)' — синтез ФДФ из Ф-6-Ф и свободного фосфата (вместо фосfogексокиназной реакции).

Суммой реакций: (1)' + (2) + (3)' + (4) + (5) + 2[(6) + (7) + (8) + (9) + (10) + (11)] будет реакция А.



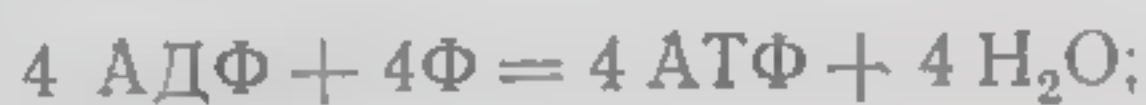
Принимая во внимание, что $\Delta G'$ для реакции (1)' равно $+2600$ кал/моль, и используя такое же значение $\Delta G'$ для реакции (3)', вычислим, что для реакции А $\Delta G'_A = -16\,000$ кал/моль.

Для суммарной реакции гликолиза Б:



$$\Delta G_B = -47\,000 \text{ кал/моль}.$$

Вычтем из уравнения А уравнение Б и получим:



$$\Delta G = +31\,000 \text{ кал}.$$

$$\Delta G' = \frac{-31\,000}{4} \approx -8000 \text{ кал/моль (гидролиза АТФ)}.$$

Полученная величина $\Delta G' = -8000$ кал/моль согласуется с рассчитанными другими путями значениями $\Delta G'$ этой реакции.

Рассмотрим энергетическую характеристику отдельных промежуточных реакций. Гексокиназную (1) и фосfogексокиназную (3) реакции следует отнести к практически необратимым стадиям гликолиза. Действительно, можно рассчитать, что при величине отношения $\frac{[\text{АТФ}]}{[\text{АДФ}]} = 1$ отношение концентраций $\frac{[\text{Г-6-Ф}]}{[\text{Гл}]}$ и $\frac{[\text{ФДФ}]}{[\text{Ф-6-Ф}]}$ в равновесии будет равно 10^3 . Обращение же направления этих реакций было бы возможным только при еще большей величине отношения соответствующих концентраций. Равновесие реакции (2) устанавливается при отношении концентрации $\frac{[\text{Ф-6-Ф}]}{[\text{Г-6-Ф}]} = \frac{1}{2}$. Альдолазная (4) реакция интересна тем, что она является выражено эндотермичной. В условиях 1 М концентраций реакция весьма эндэргонична, однако при физиологических концентрациях промежуточных продуктов она самопроизвольно течет в направлении образования триозофосфатов. Изменение направления альдолазной реакции может осуществляться относительно легко. Так, например, уже при концентрации ФДА 0,004 М и указанных в табл. 3 концентрациях триозофосфатов эта реакция пойдет в направлении образования ФДФ.

В условиях физиологических концентраций реакции (6) и (7) характеризуются нулевыми значениями ΔG . Это означает, что концентрации исходных и конечных продуктов соответствуют состоянию равновесия и повышение концентрации конечных продуктов должно привести к течению реакции в направлении, обратном поступательному ходу гликолиза. Так, если величина отношения $\frac{[\text{КоН}]}{[\text{Ко}]}$ станет больше, чем $\frac{1}{2}$, или же концентрация свободного фосфата станет меньше, чем 0,005 М, то реакция (6) пойдет в направлении образования 3-ФГА. При величине отношения $\frac{[\text{АТФ}]}{[\text{АДФ}]} > 1$ реакция (7) пойдет в направлении образования 1,3-ДФГК. Если же 3-ФГА и 1,3-ДФГК накопятся в n раз большем количестве, то поступательный ход процесса на этапах (6) и (7) станет возможным лишь при величине отношения $\frac{[\text{АТФ}]}{[\text{АДФ}]} > n$ (при прежних концентрациях 3-ФГК, Ф и величине отношения $\frac{[\text{КоН}]}{[\text{Ко}]}$).

Расчет позволяет дать строго количественное выражение условию поступательного хода гликолиза при выбранных физиологических концентрациях. При подстановке соответствующих значений найдем, что поступательный ход гликолиза возможен при величине отношения концентраций:

$$\frac{[\text{KoH}]}{[\text{Ko}]} \frac{[\text{ATФ}]}{[\text{АДФ}][\text{Ф}]} = \frac{1}{2} \frac{1}{10,005} \leq 100.$$

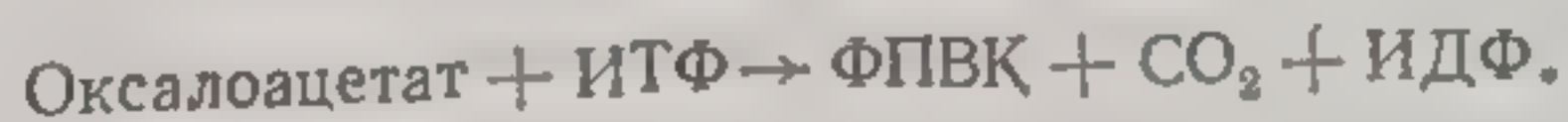
Таким образом, решающее влияние на ход гликолиза должны оказывать величины отношений концентраций $\frac{[\text{KoH}]}{[\text{Ko}]}$ и $\frac{[\text{ATФ}]}{[\text{АДФ}]}$ и концентрация свободного фосфата. Следует учесть, что в результате реакции (6) происходит сопряженное с окислением фосфорилирование и образуется богатая энергией фосфатная связь.

По сравнению с другими промежуточными продуктами гликолиза концентрации 3-ФГА и особенно 1,3-ДФГК являются весьма малыми. Вполне вероятно, что относительно небольшое (в абсолютном выражении) изменение концентраций этих веществ может оказать существенное влияние на ход гликолитического процесса.

Равновесие в реакции (8) устанавливается при величине отношения концентраций $\frac{[\text{2-ФГК}]}{[\text{2-ФГК}]} = 0,18$.

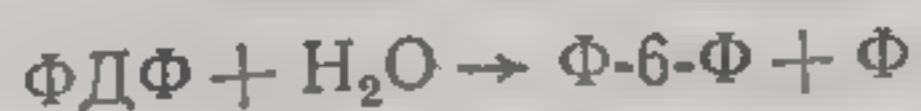
Легко обратимая энолазная реакция (9) приводит к образованию богатой энергией фосфатной связи в ФПВК. Равновесие устанавливается при величине отношения концентраций: $\frac{[\text{ФПВК}]}{[\text{2-ФГК}]} = 3$.

В результате реакции (10): $\text{ФПВК} + \text{АДФ} = \text{ПВК} + \text{ATФ}$, для которой $\Delta G_{\text{ф}} = -6000$ кал/моль, образуется ATФ; эта реакция может пойти в обратном направлении лишь при величине отношения $\frac{[\text{ATФ}]}{[\text{АДФ}]} > 22\,000$, что, конечно, нереально в физиологических условиях. Обращение процесса гликолиза на этом этапе было бы вероятным, если донором богатой энергией фосфатной связи для пирувата выступило соединение, для которого $\Delta G'$ гидролиза имело бы величину порядка $-12\,000$ кал/моль. Однако пока не имеется данных о фосфорилировании ПВК такого рода соединениями. Возможен обходный путь образования ФПВК из ПВК, а именно через стадии малата и оксалоацетата:



Весьма вероятно, что именно этот путь синтеза ФПВК имеет место при обращении гликолиза.

После образования ФПВК вполне реально обращение процесса гликолиза до стадии ФДФ. Превращение же последнего в глюкозу может осуществиться самопроизвольно в результате действия фруктозодифосфатазы:



с последующим гидролизом гексозофосфата. Таким образом, с точки зрения энергетической характеристики необходимым условием обращения гликолиза следует считать образование ФПВК [однако не в результате обращения реакции (10)].

Для обращения реакции (11) $\text{ПВК} + \text{KoH} \rightleftharpoons \text{Лактат} + \text{Ko}$ в условиях приведенных физиологических концентраций лактата и пиру-

вата необходимо, чтобы величина отношения $\frac{[Ko]}{[KoH]}$ была бы больше 300. Насколько позволяют судить литературные данные, в тканях не наблюдается такого выраженного преобладания окисленной формы кодегидрогеназы над восстановленной. Можно предположить, что окисление лактата до пирувата осуществляется другой дегидрогеназой с более высоким значением E_o' .

Определение фактических концентраций промежуточных продуктов гликолиза в различных условиях функционирования тканей позволяет сделать заключение, в каком направлении протекают соответствующие промежуточные реакции гликолиза, а следовательно, и процесс в целом (так как нельзя представить себе устойчивого состояния, при котором одни реакции гликолиза идут в направлении образования лактата, а другие — в направлении ресинтеза глюкозы). Например, если при определении содержания в ткани Г-6-Ф и Ф-6-Ф будет найдено, что отношение концентраций этих веществ составляет $\frac{[Ф-6-Ф]}{[Г-6-Ф]} \ll \frac{1}{2}$, это будет указывать на течение фосфогексоизомерной реакции в направлении образования Ф-6-Ф. Величина отношения концентраций $\frac{[Ф-6-Ф]}{[Г-6-Ф]} \gg \frac{1}{2}$ будет говорить о ходе реакции в направлении образования Г-6-Ф. Аналогичные рассуждения приложимы при рассмотрении величин отношений концентраций других промежуточных продуктов, например $\frac{[ФПВК]}{[2-ФГК]}$. Следует отметить, что подобный анализ до сих пор почти не применялся в физиолого-биохимических исследованиях, хотя в ряде случаев он мог бы оказаться весьма полезным.

На основании данных по энергетике процесса представляется возможным проанализировать ряд особых случаев течения гликолитического процесса: торможение гликолиза дыханием («Пастеровский эффект»), а также аэробный гликолиз. Есть основания считать, что этапы окислительных превращений глюкозы совпадают с реакциями гликолиза до стадии образования пирувата (реакции гексозофосфатного шунта не рассматриваем). В результате осуществления процессов фосфорилирования, сопряженных с полным окислением глюкозы, должна существенно увеличиться величина отношения $\frac{[АТФ]}{[АДФ]}$ и уменьшиться концентрация свободного фосфата, тогда величина

отношения $\frac{[KoH]}{[Ko]} \frac{[АТФ]}{[АДФ] [Ф]}$ станет значительно > 100 , а это приведет к торможению поступательного хода гликолиза на этапах (6) и (7). Более того, на этапах реакций (6) и (7) и процесс пойдет в направлении образования 3-ФГА и будет продолжать идти в этом направлении до тех пор, пока увеличение концентрации 3-ФГА и уменьшение концентраций КоН и 3-ФГК не компенсирует увеличения величины отношения $\frac{[АТФ]}{[АДФ] [Ф]}$. Главным ком-

пенсирующим изменением в условиях осуществления окислительных процессов, по-видимому, следует считать уменьшение концентрации восстановленной формы кодегидрогеназы, которая в этих условиях будет иметь возможность разряжаться не только на пируват, но и на цитохромную систему. В результате же уменьшения концентраций КоН и 3-ФГК (а следовательно, и продукта превращения последней — пирувата) будет образовываться меньше лактата. Кроме того, в этих условиях весьма вероятно окисление лактата под действием дегидрогеназы с относительно высоким значением E_o' . Таким образом, будет наблюдаться «торможение образования молочной кислоты», т. е. одна из характерных черт Пастеровского эффекта.

В том же случае, если величина отношения $\frac{[АТФ]}{[АДФ] [Ф]}$ в аэробных условиях

не будет заметно возрастать, что может зависеть либо от слабой выраженности сопряженных с окислением глюкозы процессов фосфорилирования, либо от быстрого дефосфорилирования АТФ, то не возникнет условий, приводящих к уменьшению концентрации КоН и 3-ФГК, как это было в предыдущем случае, а следовательно, сохранятся благоприятные возможности для восстановления пирувата в лактат, т. е. будет иметь место аэробный гликолиз.

Рассмотрение энергетических соотношений позволяет объяснить также ряд особых случаев, наблюдаемых при сбраживании глюкозы, а именно накопление в определенных условиях ФДФ и 3-ФГК. В связи с этим следует остановиться на тесной взаимозависимости между состоянием адениловой и кодегидрогеназной систем и распределением фосфорных эфиров на промежуточных этапах гликолиза. Допустим, что на промежуточных этапах гликолиза, начиная с реакции расщепления ФДФ и до реакции образования ФПВК, установилось состояние равновесия. Подобное состояние должно возникать в некоторых случаях и в физиологических условиях. Так, например, при изменении направления течения процесса, когда гликолиз сменяется ресинтезом глюкозы из пировиноградной или молочной кислот, направление течения промежуточных реакций от ФПВК до ФДФ изменяется на противоположное; следовательно, каждая из промежуточных реакций проходит через состояние равновесия. Зная величины констант равновесий промежуточных реакций гликолиза, можно выразить величины равновесных концентраций промежуточных продуктов через равновесную концентрацию одного из промежуточных продуктов и величины отношений концентраций $\frac{[АТФ]}{[АДФ]}$ и $\frac{[КоН]}{[Ко]}$. Подобный расчет представлен в табл. 5, в которой равновесные концентрации промежуточных продуктов выражены через концентрацию ФПВК (а) и величины отношений $\frac{[АТФ]}{[АДФ]}$ и $\frac{[КоН]}{[Ко]}$.

Таблица 5

Равновесные концентрации промежуточных продуктов гликолиза

№ реакции	Константа равновесия	Равновесная концентрация промежуточного продукта
4	$K_4 = \frac{[3-ФГА][ФДА]}{[ФДФ]} = 0,000115^*$	$[ФДФ] = 822 \cdot \frac{[КоН][АТФ]}{[Ко][АДФ]} (a)^2$
5	$K_5 = \frac{[3-ФГА]}{[ФДА]} = 0,046$	$[ФДА] = 1,5 \cdot \frac{[КоН][АТФ]}{[Ко][АДФ]} (a)$
6	$K_6 = \frac{[3-ФГК][КоН][АТФ]}{[3-ФГА][Ко][АДФ]} = 28,2^{**}$	$[3-ФГА] = 6,3 \cdot 10^{-2} \cdot \frac{[КоН][АТФ]}{[Ко][АДФ]} (a)$
7	$K_7 = \frac{[2-ФГК]}{[3-ФГК]} = 0,182$	$[3-ФГК] = 1,77 (a)$ $[2-ФГК] = 0,32 (a)$
8	$K_8 = \frac{[ФПВК]}{[2-ФГК]} = 3,1$	$[ФПВК] = a$

* Константа равновесия рассчитана при условии установления равновесия между 3-ФГА и ФДА.

** При концентрации фосфата 0,005 М.
Исходные данные для констант равновесия см. в табл. 2.

По данным табл. 5 можно найти отношение равновесных концентраций ФДФ, ФДА и 3-ФГК:

$$[\text{ФДФ}] : [\text{ФДА}] : [3\text{-ФГК}] = 822 \left(\frac{[\text{КоН}] [\text{АТФ}]}{[\text{Ко}] [\text{АДФ}]} \right)^2 a^2 : 1,5 \frac{[\text{КоН}] [\text{АТФ}]}{[\text{Ко}] [\text{АДФ}]} a : 1,77 a.$$

ФДФ накапливается в бродящей смеси в том случае, когда среди комплекса ферментов брожения инактивирован фермент аденозинтрифосфатаза. В результате этого создаются благоприятные условия для значительного повышения величины отношения $\frac{[\text{АТФ}]}{[\text{АДФ}]}$, особенно после того как будут фосфорилированы глюкоза и гексозофосфат — акцепторы богатых энергией связей; при этом не создается предпосылок для увеличения величины отношения $\frac{[\text{Ко}]}{[\text{КоН}]}$.

Так, при $\frac{[\text{АТФ}]}{[\text{АДФ}]} = 50$, $\frac{[\text{КоН}]}{[\text{Ко}]} = 1$ и $a = 3 \times 10^{-4} \text{ М}$ ($[3\text{-ФГК}] = 5,3 \cdot 10^{-4} \text{ М}$) найдем, что отношение равновесных концентраций составит:

$$[\text{ФДФ}] : [\text{ФДА}] : [3\text{-ФГК}] = 0,18 \text{ М} : 0,02 \text{ М} : 0,00053 \text{ М}.$$

Следовательно, в рассматриваемых условиях при установлении равновесия на промежуточных этапах концентрация ФДФ будет значительно превышать концентрации других промежуточных продуктов; при течении же процесса в направлении образования пировиноградной кислоты отношение концентраций промежуточных продуктов должно еще в большей степени складываться в пользу ФДФ. Рассчитанное выше отношение величин равновесных концентраций промежуточных продуктов имеет место при концентрации фосфата 0,005 М и рН 7. При уменьшении концентрации свободного фосфата и подкислении среды преимущественное накопление ФДФ должно быть еще более выраженным.

Накопление 3-ФГК имеет место при добавлении к бродящей смеси фтористого натрия и уксусного альдегида. Фтористый натрий в присутствии свободного фосфата угнетает фермент энолазу, катализирующий превращение 2-ФГК в ФПВК. Уксусный альдегид добавляется для окисления образующейся в ходе брожения восстановленной кодегидрогеназы. В этом случае можно полагать, что величина отношения окисленной и восстановленной форм кодегидрогеназы будет иметь относительно высокое значение порядка $\frac{[\text{Ко}]}{[\text{КоН}]} \geq 20$, величина же отношения $\frac{[\text{АТФ}]}{[\text{АДФ}]}$, учитывая отсутствие фосфорилирования за счет ФПВК, будет иметь относительно низкое значение порядка $\frac{[\text{АТФ}]}{[\text{АДФ}]} \approx 1$. В этих условиях при $a = 0,1 \text{ М}$ ($[3\text{-ФГК}] = 0,177 \text{ М}$) найдем, что отношение равновесных концентраций промежуточных продуктов будет иметь значение:

$$[\text{ФДФ}] : [\text{ФДА}] : [3\text{-ФГК}] = 0,02 \text{ М} : 0,007 \text{ М} : 0,18 \text{ М},$$

т. е. будет накапливаться 3-ФГК.

Приведенная выше энергетическая характеристика гликолиза позволяет сформулировать условия осуществления поступательного хода процесса, дает возможность объяснить накопление того или иного промежуточного продукта в некоторых особых условиях протекания рассматриваемого процесса и определить количество улавливаемой клеткой химической энергии при превращении глюкозы в молочную кислоту.

Более полная энергетическая характеристика промежуточных реакций обмена веществ позволит предвидеть возможные изменения в ходе обмена веществ при различных воздействиях на его промежуточные этапы.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТФ	— аденозинтрифосфат
АДФ	— аденозиндифосфат
ИТФ	— инозинтрифосфат
ИДФ	— инозиндифосфат
УДФ	— уридиндифосфат
УДФГл	— уридиндифосфат-глюкоза
ФФФ	— трофосфат
ФФ	— пирофосфат
Ф	— свободный фосфат
Г-1-Ф	— глюкозо-1-фосфат
Г-6-Ф	— глюкозо-6-фосфат
Ф-6-Ф	— фруктозо-6-фосфат
ФДФ	— фруктозодифосфат
3-ФГА	— 3-фосфоглицериновый альдегид
ФДА	— фосфодиоксиацетон
3-ФГК	— 3-фосфоглицериновая кислота
2-ФГК	— 2-фосфоглицериновая кислота
ФПВК	— фосфопироват
ПВК	— пироват
Гл	— глюкоза
Глиц	— глицерин
ГлицФ	— глицерофосфат
Ко	— дифосфопиридиннуклеотид (окисл.)
КоН	— дифосфопиридиннуклеотид (восст.)
КоА	— кофермент-А
Ацетил-КоА	— ацетилкофермент-А

ЛИТЕРАТУРА

1. Брей Д., Уайт К. Кинетика и термодинамика биохимических процессов. М., ИЛ., 1959.
2. Владимиров Г. Е. Некоторые новые данные по энергетической характеристике реакций гликолиза. Ученые записки ЛГУ имени А. А. Жданова, 1954, № 164, 328.
3. Котельникова А. В. Успехи биологической химии, 1950, 1, 338.
4. Нейландс Д., Штумпф П. Очерки по химии ферментов. М., ИЛ., 1958.
5. Таусон В. О. Основные положения растительной биоэнергетики. М., 1950.
6. Рагдее А. В. В кн.: Chemical Pathways of Metabolism I, 1954, 1—61.
7. Паркс Г., Хаффман Г. Свободные энергии органических соединений. М., ОНТИ, 1936.
8. Кребс Г., Корнберг Г. Превращения энергии в живых системах. М., ИЛ, 1959.
9. Гинодман Л. М. Биохимия, 1954, 19, 666.
10. Дыхательные ферменты. М., ИЛ, 1952.
11. Владимиров Г. Е., Власова В. Г., Колотилова А. И., Лызова С. Н., Пантелеева Н. С. Биохимия, 1957, 22, 963.
12. Владимиров Г. Е., Гинодман Л. М. Биохимия, 1953, 18, 420.
13. Гинодман Л. М. Энергетическая характеристика промежуточных реакций гликолиза. Реферат диссертации. Л., 1950.
14. Владимиров Г. Е. В сб.: Фосфорилирование и функция. Л., ИЭМ, 1960, стр. 44.
15. Lipman F. Advanc. in Enzym, 1941, 1, 99, 1946, 6, 231.

ГЛАВА IX

СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ И ОБМЕН СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Н. А. Юдаев

Первый кортикостероид — кортикостерон — был выделен из экстракта надпочечников в 1935 г. За последующие 26 лет выделено более 40 кортикостероидов. Для всех этих соединений установлено химическое строение; многие из них, наиболее важные в биологическом отношении, синтезированы химическим путем.

В 1948 г. было неожиданно установлено, что один из стероидов, выделенных из коры надпочечников, — кортизон, с успехом может применяться при лечении тяжелых форм ревматоидного артрита. Впоследствии выяснилось, что указанный стероид эффективен при ряде заболеваний: хроническом прогрессирующем полиартрите, остром суставном ревматизме, генерализованной эритематозной волчанке, анкилозирующем спондилоартрите, бронхиальной астме, полиморфной эритеме, некоторых болезнях крови, некоторых формах туберкулеза и др.

Благодаря широте лечебного применения и необычному характеру действия кортикостероиды привлекли внимание широкого круга исследователей и стали предметом интенсивного изучения химиков, биохимиков, фармакологов и клиницистов. Были синтезированы не только природные кортикостероиды, но и создан ряд аналогов гормонов, более активных, чем природные соединения; изучены пути биосинтеза и катаболизма стероидов в организме в норме и при патологии, накоплено огромное количество сведений о характере их действия на обмен.

Поскольку общее число стероидов, выделенных из надпочечников, синтезированных химиками и образующихся в организме в результате катаболизма в норме и патологии, достигает нескольких сотен, понятно, что изучение закономерностей их образования и роли в организме составляет содержание новой отрасли биохимии.

СТЕРОИДЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ТКАНИ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Как уже указывалось, из ткани надпочечников выделено более 40 различных стероидов. Однако значительная их часть биологически неактивна и лишь 8 соединений обладают способностью в той или иной степени воспроизводить действие экстракта коры надпочечника. Эти соединения следующие: альдостерон, гидрокортизон, кортизон, кортикостерон, 11-дегидрокортикостерон, 11-дезоксикортикостерон, 17-окси-11-дезоксикортикостерон и 19-оксикортикостерон.

Кроме собственно кортикостероидов, из надпочечников были выделены стерон или к мужским половым гормонам — эстрон, прогестерон или к женским половым гормонам — андростендион, адреностерон, кортикостероиды являются производными прегнана. Неактивные кортикостероиды могут быть производными прегнана или аллопрегнана.

Формулы и названия основных стероидов, выделенных из надпочечников, см. на рис. 1, 2 и в табл. 1.

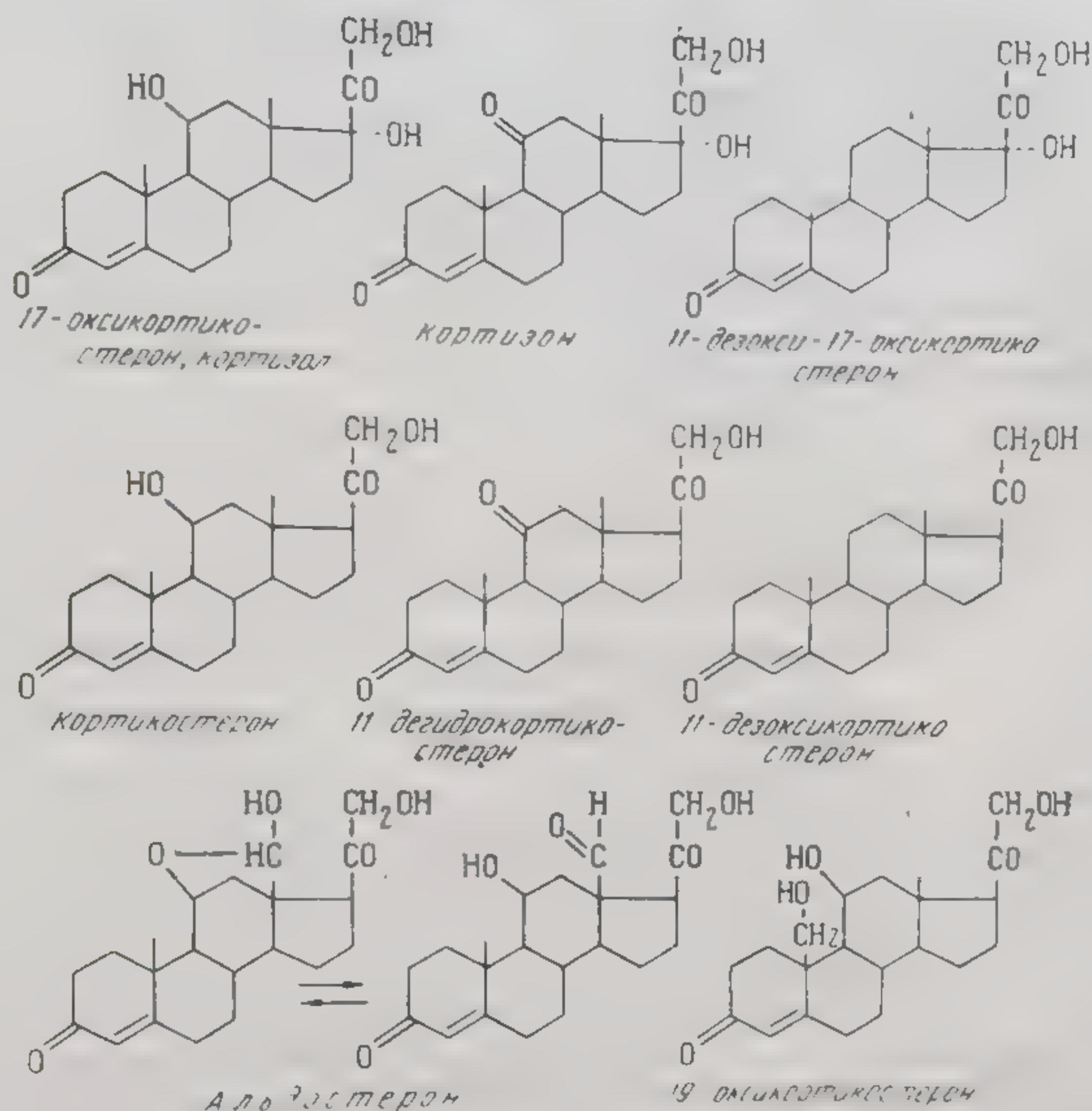


Рис. 1. Структурные формулы основных физиологически активных кортикостероидов.

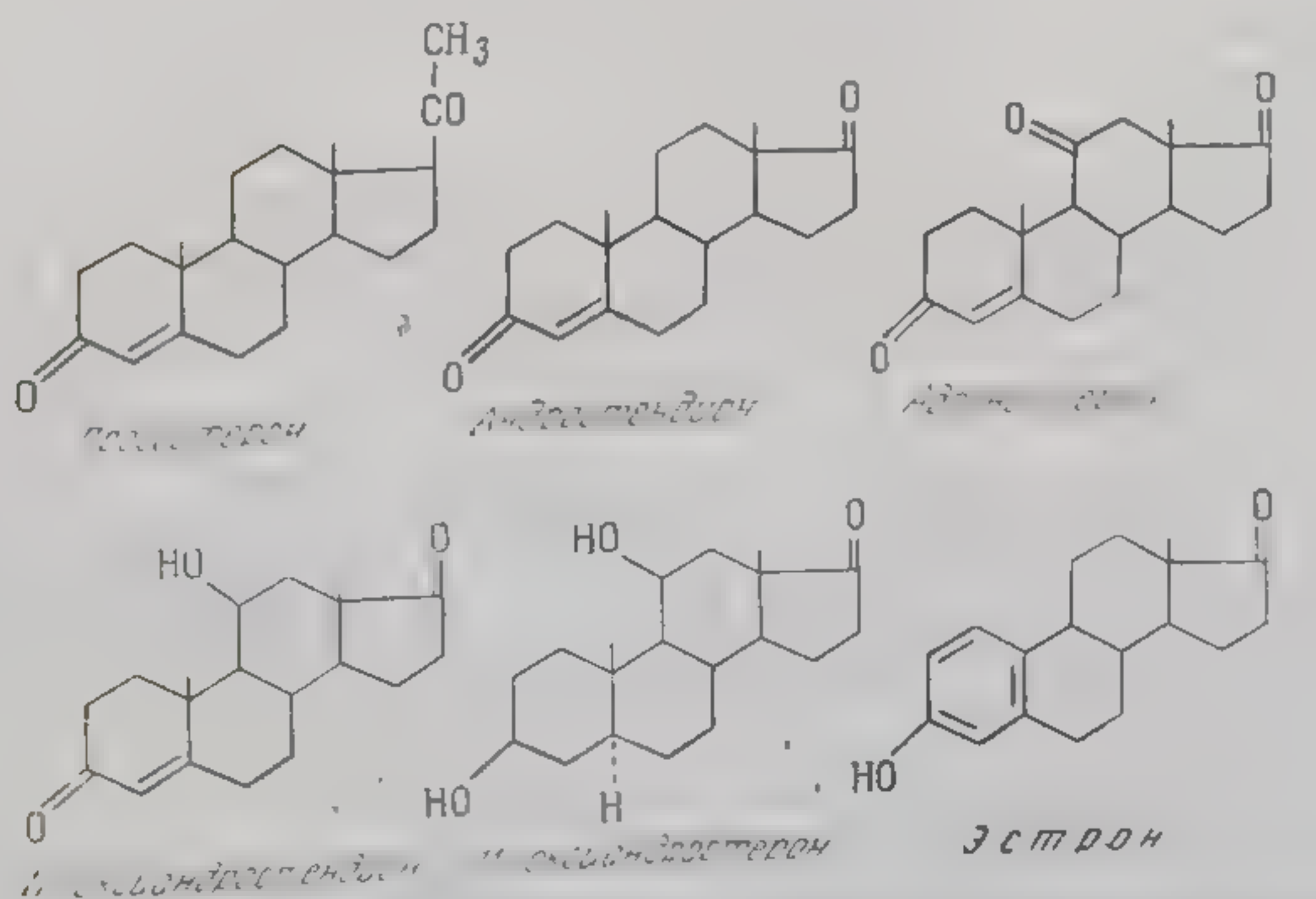


Рис. 2. Структурные формулы половых гормонов, выделенных из ткани надпочечников.

Таблица 1

Природные биологически активные кортикостероиды, андрогены
и эстрогены, выделенные из ткани надпочечников

Название стероида	Рациональное название	Буквенное обозначение			Эмпирическая формула	Температура плавления	[α] _D [°]
		Рейхштейн	Кендал	Вингерштейн			
Кортизол, гидрокортизон, 17-оксикортикостерон	Δ ⁴ -прегнен-11 β, 17 α, 21-триол-3,20-дион	M	F	—	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	220	+167
Кортизон	Δ ⁴ -прегнен-17 α, 21-триол-3,11,20-трион	F	E	F	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	215	+209
Альдостерон	Δ ⁴ -прегнен-11,21-диол-3,20-дион-18-аль	—	—	—	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	219	+ 88
19-оксикортикостерон	Δ ⁴ -прегнен-11 β, 19,21-триол-3,20-дион	—	—	—	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	192	—
17-окси-11-дезоксикортикостерон	Δ ⁴ -прегнен-17 α, 21-диол-3,20-дион	S	—	—	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	205	+132
Кортикостерон	Δ ⁴ -прегнен-11 β, 21-диол-3,20-дион	H	B	—	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	182	+223
11-дегидрокортикостерон	Δ ⁴ -прегнен-21-ол-3,11,20-трион	—	A	—	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	180	+229
11-дезоксикортикостерон, кортексон	Δ ⁴ -прегнен-21-ол-3,20-дион	Q	—	—	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	142	+178
Прогестерон	Δ ⁴ -прегнен-3,20-дион	—	—	—	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	121/128	+192
Андростендион	Δ ⁴ -андростен-3,17-дион	—	—	—	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	174	+190
Адреностерон	Δ ⁴ -андростен-3,11,17-трион	—	—	—	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	224	+262
11 β-оксиандростендион	Δ ⁴ -андростен-11 β-ол-3,17-дион	—	—	—	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	199	+203
11 β-оксиандростерон	Андростан-3 β, 11 β-диол-17-он	—	—	—	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	235	+ 84
Эстрон	Δ ¹ ,3,5 [10] эстриен-3-ол-17-он	—	—	—	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	260	+165

Из перечисленных выше кортикостероидов наибольшее внимание исследователей привлекли кортизон и гидрокортизон, так как они обладают наиболее выраженным действием на организм. Они весьма активны в отношении влияния на обмен, которое в самом общем виде можно свести к стимуляции процесса превращения белков в углеводы. Эти стероиды тормозят образование соединительной ткани, вызывают лизис лимфоидных образований, оказывают тормозящее влияние на воспалительный процесс.

Благодаря указанным свойствам эти два стероида нашли широкое применение в различных клиниках. Однако в процессе применения гормонов выяснилось, что, поскольку кортикостероиды не являются лечебными препаратами в общепринятом смысле слова и лечебный эффект их — лишь результат многообразного обычного для них действия на обмен веществ, длительное применение их в больших дозах приводит наряду с положительным действием к таким нежелательным изменениям в обмене веществ, как задержка в организме солей натрия и воды, в результате чего образуются отеки, а также изменения обмена в мозгу, сопровождающиеся повышением возбудимости центральной нервной системы и появлением бессонницы. Длительное применение кортикостероидов сопровождается частичной атрофией коры надпочечников.

Нарушения, возникающие при лечебном применении кортикостероидов, поставили вопрос об изменении химического строения природных гормонов с целью усиления их положительного действия и ослабления нежелательного действия.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КОРТИКОСТЕРОИДОВ

В настоящее время известно большое число различного рода производных кортикостероидов. Мы упомянем лишь те из активных стероидов, которые нашли применение в лечебной практике. В качестве одного из ран-

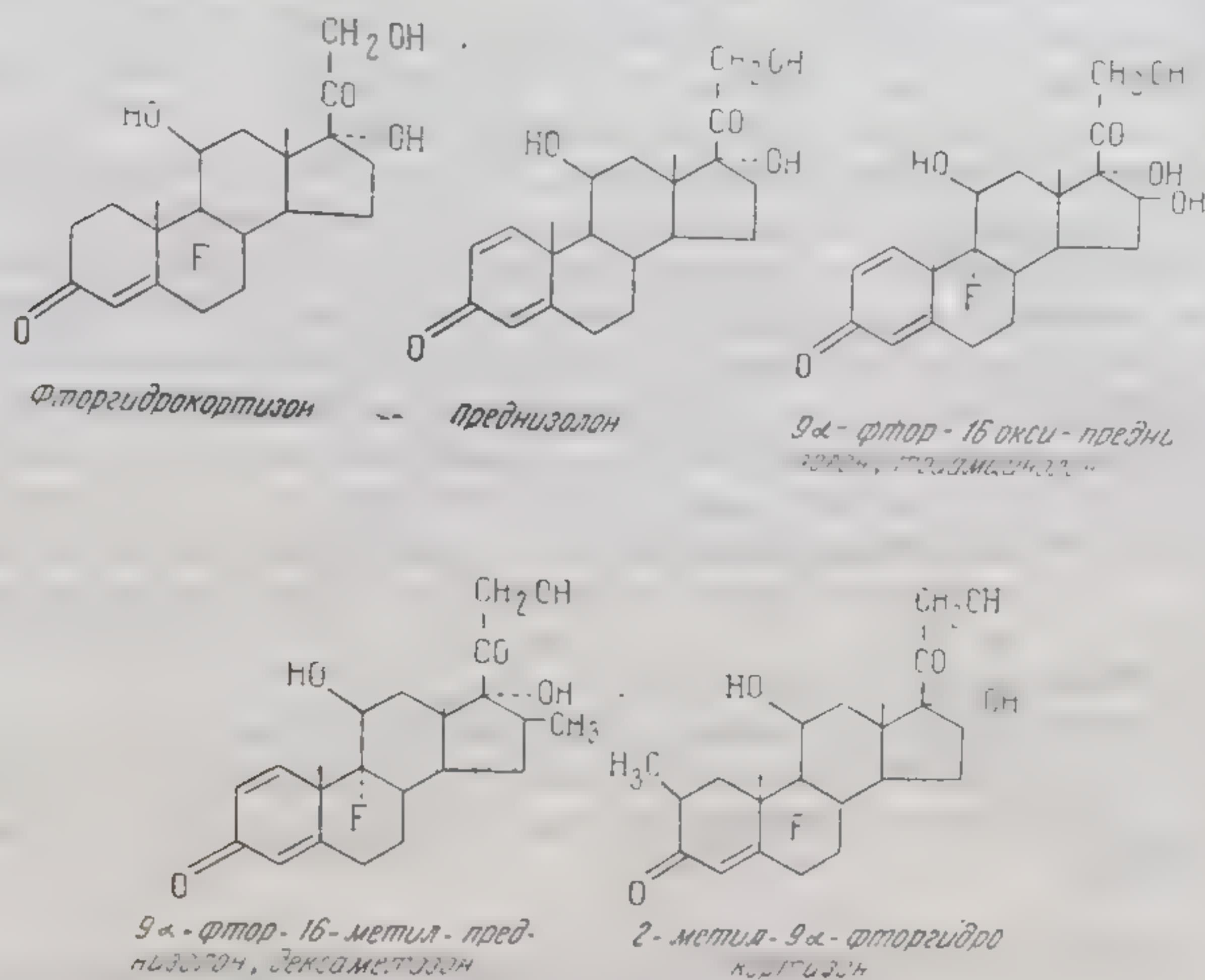


Рис. 3. Структурные формулы биологически активных производных кортикостероидов.

них соединений этой группы следует назвать фторгидрокортизон, отличающийся от природного гормона лишь наличием атома фтора в 9-м положении (см. рис. 3, табл. 2).

Таблица 2

Биологическая активность кортикостероидов и их аналогов

Название стероида	Отложение гликогена	Влияние на обмен электролитов	Эозинофилия	Антиревматические действия	Угнетение образования гранулемы	Относительная доза
Гидрокортизон [F]	1	1	1	1	1	100
Кортизон [F]	0,8	0,8	0,8	0,8	1	130
Преднизолон [ΔF]	4	1	3	4	20	25
Преднизон [Δ ¹ E]	3	1	3	3	16	30
Альдостерон	0,3	50	—	0	0	—
9α-фторгидрокортизон [9αFF]	20	50	20	20	20	5
Δ ¹ 9α-фторгидрокортизон	20	50	20	20	—	3
Δ ¹ 9α-фторгидрокортизон	10	200	2	—	40	—
2-метил-фторгидрокортизон	10	—	3	4	—	20
Δ ¹ 6-метил-гидрокортизон	—	—	—	—	—	—
Триамцинолон [Δ ¹ 9α-фтор-16-оксифтор-16-метил-F]	30	—	3	4	10	25
Дексаметазон [Δ ¹ 9α-фтор-16-метил-F]	17	0	15	28	190	4

Из табл. 2, в которой приведены различные виды активностей, видно, что незначительное изменение в молекуле стероида в 20—50 раз увеличено

его активность. Стероид используется главным образом как минералкортикоид.

В качестве второго соединения следует назвать преднизолон, который отличается от гидрокортизона лишь одной дополнительной двойной связью между 1-м и 2-м углеводным атомом. Оказалось, что такое изменение в структуре молекулы природного гормона сильно повысило его активность, что дало возможность снизить лечебную дозу и, таким образом, уменьшить его побочное действие. В настоящее время стероид используется более широко, чем природный гормон гидрокортизон.

Наибольший интерес представляет дексаметазон, или декадрон, который уже более существенно отличается от гидрокортизона. У него имеется дополнительная двойная связь, в 9-м положении — атом фтора, а в 16-м положении — метильная группа. Эти изменения сделали его в 190 раз более активным в отношении торможения образования гранулемы, в 28 раз более активным антиревматоидным средством и в 17 раз повысили его способность стимулировать отложение гликогена в печени. Вместе с тем минералкортикоидной активности у данного соединения не обнаружено и, следовательно, его можно применять, не опасаясь вызвать отек, хотя других побочных действий он не лишен. Было получено соединение (2-метил-9 α -фторгидрокортизон), которое оказалось в 4 раза более активным минералкортикоидом, чем природный гормон альдостерон.

Приведенные здесь данные, как нам кажется, убеждают в том, что исследования в области модификации молекулы природных гормонов могут привести к дальнейшему улучшению существующих гормонов как лечебных препаратов.

КОРТИКОСТЕРОИДЫ, СЕКРЕТИРУЕМЫЕ НАДПОЧЕЧНИКАМИ В КРОВЬ

Наличие биологической активности у указанных 8 соединений не может служить доказательством того, что эти стероиды являются гормонами, секретируемыми надпочечниками в кровь в естественных условиях. Как уже говорилось, в настоящее время показано, что некоторые даже искусственно полученные производные гидрокортизона обладают в несколько раз более высокой активностью, чем природное соединение. Правильное представление о природе секретируемых кортикостероидов было получено в результате тщательного изучения кортикостероидов в крови, оттекающей от надпочечников, одновременно с изучением крови, притекающей к надпочечникам.

Исследования, проведенные в этом плане, главным образом на собаках, показали, что до 80% общего количества кортикостероидов, выделяемых надпочечниками, приходится на долю двух стероидов — кортикостерона и 17-оксикортикостерона; около 1% — на долю постоянно присутствующего в надпочечниковой крови альдостерона. В незначительных количествах некоторыми авторами обнаружен в надпочечниковой крови 11-дезоксип-17-оксикортикостерон (соединение S). Выявлен в следовых количествах и дезоксикортикостерон, однако его нельзя рассматривать как постоянно секретируемый стероид, поскольку кровь собиралась в условиях острого опыта. В незначительных количествах из надпочечников в кровь могли выходить промежуточные продукты синтеза кортикостероидов, к числу которых, как известно, относится и дезоксикортикостерон.

Существующие в настоящее время данные с большой долей вероятности позволяют считать, что в нормальных условиях деятельности надпочечника из перечисленных кортикостероидов секретируются лишь три: 17-оксикортикостерон, кортикостерон и альдостерон. Три названных соединения могут

восстановить все основные нарушения в организме, возникающие после удаления коры надпочечников. 17-оксикортикостерон восстанавливает нарушения, связанные с обменом белков, углеводов и жиров, а альдостерон нормализует обмен солей и воды. Кортикостерон по своему действию в известной степени занимает промежуточное положение между двумя названными стероидами. Хотя исследования надпочечниковой крови человека связаны с определенными трудностями, полученные результаты дают основания считать, что надпочечниками человека секретируются те же три кортикостероида, что и надпочечниками многих животных.

Подавляющая часть данных о содержании кортикостероидов в надпочечниковой крови людей получена при изучении крови больных раком грудной железы, поскольку с целью лечения этих больных часто удаляют надпочечники и вследствие этого предоставляется возможность взятия надпочечниковой крови. Последнее обстоятельство сильно затрудняет решение вопроса о том, какие из обнаруживаемых стероидов являются постоянными компонентами надпочечниковой крови и какие появляются в результате болезни.

Результаты исследования 12 образцов крови больных раком груди приводятся в табл. 3 [2].

Таблица 3
Стероиды в надпочечниковой крови людей в μ г/100 мл

№ п/п	Кортизол	Кортикостерон	Соединение S	11- β -оксандростен-3,17-дион	17 α -оксипрогестерон	ДЭА (дегидроэпиандростерон)
1	56,2	24,0	9,8	53,9	0	0
2*	143,9	8,5	21,0	132,3	0	0
3	78,5	15,4	0	63,3	0	0
4	35,3	0	0	25,3	0	0
5	59,3	5,2	7,7	47,9	22,4	0
6	119,7	0	10,0	0	0	0
7+	28,1	0	5,0	0	5,4	0
8†	188,1	13,0	0	130,7	0	40,5
9	162,3	22,0	0	17,7	21,0	0
10	52,9	0	0	9,8	0	0
11	5,6	0	0	6,1	20,4	0
12§	13,7	0	0	135,0	16,3	0

Дополнительные симптомы:

* Аденома коры надпочечника.

+ Геморрагические и опухолевые поражения надпочечника.

† Психоз.

§ Узелковая гиперплазия коры надпочечника.

Как видно из табл. 3, кроме гидрокортизона и кортикостерона, в некоторых случаях выделяется ряд других стероидов. Считаем необходимым подчеркнуть, что дезоксикортикостерон, который занимает центральное место в теории возникновения болезней адаптации (Сели), не был обнаружен ни у этих, ни у других исследовавшихся многими авторами больных. Таким образом, существование в организме так называемых противовоспалительных кортикостероидов пока никем не доказано.

Вместе с тем на основании существующих в настоящее время данных мы имеем возможность предполагать, что при изменившихся физиологических условиях или при патологическом состоянии в организме могут воз-

никать стероиды с необычным характером действия. Так, Нээр с сотрудниками [3] выделили из мочи больных с врожденной гиперплазией, для которых характерна повышенная потеря натрия, новое соединение — алло-прегнан-3 β 16 α -диокси-20-он. В опытах на животных было показано, что введение этого соединения повышает потерю натрия. Хотя приведенные данные и не удалось подтвердить в исследованиях на людях [4], они несомненно, представляют интерес.

С точки зрения оценки лечебного действия кортикостероидов очень важным является вопрос о суточной величине их образования надпочечниками человека. Достоверные данные по этому вопросу получены лишь в последнее время с помощью метода разведения радиоактивных стероидов, вводимых в кровеносное русло [5] (табл. 4).

Таблица 4
Секреция кортикостероидов (в мг за 24 часа)

Гидрокортизон	4,9 — 27,9
Кортикостерон	0,84 — 4,0
Альдостерон	0,15 — 0,4
Общее количество гидрокортизона в организме	1,1 — 2,4
После введения АКТГ	
Образование гидрокортизона	150
Общее количество гидрокортизона в организме	10

Как видно из табл. 4, общее количество гидрокортизона, которое может образоваться в условиях стимуляции АКТГ, может достигать 150 мг в сутки.

Если учесть, что стимуляция надпочечников приблизительно в такой же степени, как экзогенным АКТГ, может осуществляться с помощью различного рода стрессоров, то необходимо будет признать, что дозировки кортикостероидов, применяемые с лечебной целью, мало отличаются от физиологических и во всяком случае имеют тот же порядок величин. Отсюда можно сделать вывод, и это известно из других исследований, что вводимый стероид осуществляет в организме то же действие, что и эндогенный стероид, а необходимость дополнительного введения его в условиях патологии следует рассматривать как показатель того, что надпочечники по каким-то причинам в новых условиях не обеспечивают потребностей организма. Таких причин может быть несколько: а) может повыситься потребность организма в стероидах в такой степени, что надпочечники данного человека не будут способны ее обеспечить; б) в организме могут произойти изменения, в результате которых образующиеся кортикостероиды либо будут очень быстро разрушаться, либо связываться белками и тем самым выводиться из сферы действия. В этих случаях организм будет испытывать недостаток гормонов, хотя надпочечники их производят в достаточном количестве; в) и, наконец, можно допустить, что у некоторых тканей падает чувствительность к стероидам, так сказать, повышается барьер, и чтобы его достичь, необходимо искусственно создавать повышенную концентрацию гормона в организме.

В этом случае в отношении других тканей, не изменивших чувствительности, может создаться гиперконцентрация, которая обеспечит изменения, называемые обычно побочными действиями кортикостероидов. Приведенные соображения носят гипотетический характер, однако, по-видимому, они необходимы, так как о природе лечебного действия кортикостероидов

пока ничего неизвестно. Указанные выше три основных стероида обладают различной физиологической характеристикой.

Известно, что альдостерон является высокоактивным минералкортикоидом, т. е. стероидом, обеспечивающим регуляцию минерального и водного обмена.

Гидрокортизон — наиболее активный глюкокортикоид. Введение его в организм изменяет течение углеводного, белкового и жирового обмена, вызывает распад лимфоидной ткани, торможение синтеза соединительной ткани. Он обладает противовоспалительным действием и является наиболее эффективным из природных гормонов при лечении ряда заболеваний.

Кортикостерон в известной степени занимает промежуточное положение между этими двумя стероидами. Следует отметить, что он почти не действует на лимфоидную ткань, не обладает противовоспалительным действием и не эффективен при тех заболеваниях, при которых с успехом используется гидрокортизон. И, несмотря на то, что два последних стероида так сильно отличаются между собой, одни животные — обезьяна, морская свинка — секретируют преимущественно гидрокортизон, другие — кролик, крыса — преимущественно кортикостерон.

Как мы видели, надпочечники человека также в преобладающем количестве секретируют гидрокортизон.

Таким образом, у разных видов животных обмен веществ находится под контролем гормонов с различным характером физиологического действия. В связи с этим особое значение приобретают данные о том, что соотношение секретируемых гормонов может меняться. Впервые такие изменения были получены Хехтером и сотрудниками у кроликов в результате повторных введений естественного стимулятора надпочечников — АКТГ [6]. Под влиянием этого гормона наблюдалось уменьшение количества кортикостерона и резкое увеличение гидрокортизона в оттекающей от надпочечника крови. В данном случае у кроликов состав секретируемых стероидов приближался к таковому у морской свинки.

Нами совместно с Ю. А. Панковым и Н. П. Суриковой получены изменения в секреции кортикостероидов кролика и без введения АКТГ [7]. В наших опытах животные или длительное время подвергались действию холода, или у них вызывалось асептическое воспаление повторным введением скипидара. И в том, и в другом случае у кроликов наблюдалось 4-5-кратное повышение секреции гидрокортизона без заметных изменений в скорости секреции кортикостерона. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что подобного рода изменения в соотношении секретируемых кортикостероидов могут происходить и у человека [8]. В пользу этого говорят и данные, приведенные в табл. 3.

ДРУГИЕ СТЕРОИДЫ, СЕКРЕТИРУЕМЫЕ НАДПОЧЕЧНИКАМИ В КРОВЬ

Как уже указывалось выше, из ткани надпочечников, кроме кортикостероидов, были выделены стероиды андрогенной и эстрогенной природы, обычно секретируемые семенниками и яичниками. Однако известно, что обнаружение стероида в ткани железы не служит доказательством того, что данный стероид является естественным продуктом секреции железы. Исходя из этого, делались попытки обнаружить андрогены и эстрогены в крови, оттекающей от надпочечников.

В настоящее время существуют данные о том, что надпочечники выделяют ряд стероидов из группы андрогенов. К ним относятся: андростендион, 11 β -оксиандростендион, адреностерон, андростерон и дегидроэпиандро-

стерон¹. В основном эти исследования были проведены на надпочечниковой крови людей, страдающих раком груди и некоторыми другими заболеваниями. Кроме того, не все указанные выше андрогены были с несомненностью идентифицированы. Наиболее обстоятельным в этом отношении является исследование Шорт [9].

Как и в предыдущих случаях, исследованию подвергалась надпочечниковая венозная кровь больных раком грудной железы. В результате исследования, кроме гидрокортизона, кортизона и кортикостерона, были идентифицированы 11-оксиандростендион, андростендион и дегидроэпиандростерон. Суммарное количество этих трех андрогенов не превышало 80—225 $\mu\text{г}/100$ мл плазмы, что составляет $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ часть количества гидрокортизона.

Наибольшей андрогенной активностью из них обладает андростендион и наименьшей — 11 β -оксиандростендион. Имеются основания считать, что состав андрогенных стероидов у отдельных видов животных различен. Так, ни у быков, ни у свиней в надпочечниковой крови не обнаружен андростендион, хотя эти животные, по-видимому, секретируют 11-оксиандростендион [9]. Очевидно, что вопрос о секреции андрогенов надпочечниками и особенно о путях их образования нуждается в изучении.

Впервые в 1939 г. из ткани надпочечников быков был выделен эстрон [10]. Бесспорные доказательства, что надпочечники не только содержат эстрогены, но и секретируют их в кровь, получены в результате изучения мочи больных после овариэктомии и адреналэктомии [11]. В результате наблюдений отмечено, что после двусторонней овариэктомии в моче обнаруживаются эстрогены, которые исчезают после адреналэктомии. Однако попытки выявить эстрогены в надпочечниковой крови людей не дали положительных результатов [9].

Известно, что из надпочечниковой ткани выделен и гормон желтого тела — прогестерон. Изучение надпочечниковой крови животных [12] показало, что у телят, овец и свиней она содержит прогестерон в количествах от 3 до 47 $\mu\text{г}/100$ мл плазмы; надпочечниковая кровь людей содержит около 5 $\mu\text{г}/100$ мл плазмы.

Таким образом, из приведенных данных следует, что надпочечник обладает способностью синтезировать и выделять в кровь кортикостероиды, андрогены, эстрогены и прогестерон. Известно, что яичники, образующие эстрогены в качестве основных гормонов, в известных условиях могут выделять андрогены. Семенники также в условиях патологии могут выделять не только андрогены, но и кортикостероиды, и эстрогены.

Объяснить данный факт можно тем, что три вида анатомических образований — надпочечники, семенники и яичники — имеют общее происхождение и потенциально обладают способностью синтезировать все три вида стероидов. В процессе онтогенетического развития и специализации каждая из названных желез приспособилась к синтезу преимущественно одного вида гормонов, однако в качестве второстепенной и слабо выраженной функции сохранила способность синтезировать и другие гормоны. Эта второстепенная функция в условиях патологии может стать главной. Примерами могут служить некоторые опухоли надпочечников или так называемая врожденная гиперплазия надпочечников, когда надпочечниковые железы выделяют андрогены в количествах, значительно превосходящих количества кортикостероидов.

¹ Термин «андроген» в данном случае не является точным. Все эти соединения лишь по химическому строению относятся к андрогенам. По биологической активности они сильно между собой отличаются. Так, например, 11-оксиандростендион практически не обладает андрогенной активностью.

БИОСИНТЕЗ СТЕРОИДОВ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Можно считать установленным, что одним из предшественников кортикостероидов является холестерин, поскольку при перфузии изолированной железы с добавками радиоактивного холестерина в заметных количествах образуются радиоактивный кортикостерон и 17-оксикортикостерон [13]. В условиях перфузии удается наблюдать образование меченых кортикостероидов и в том случае, если добавляется не холестерин, а радиоактивная уксусная кислота. Так как холестерин образуется из уксусной кислоты, естественно было предположить, что и образование кортикостероидов из ацетата осуществляется через холестерин. Однако выделенный после перфузии надпочечников меченым ацетатом холестерин имел удельную радиоактивность в несколько раз меньшую, чем одновременно образующиеся кортикостероиды. Это заставило высказать предположение о двух разных путях превращения ацетата в холестерин и кортикостероиды. Одновременно было постулировано, что и холестерин, и кортикостероиды имеют одного общего предшественника. Пути образования кортикостероидов из ацетата и холестерина различаются не только в химическом отношении; они, по-видимому, принципиально различны и в физиологическом отношении. Это следует из того, что включение меченого холестерина в кортикостероиды усиливается естественным стимулятором деятельности надпочечников — АКТГ приблизительно в 18 раз, тогда как включение метки из ацетата практически не увеличивается этим гормоном. Следовательно, при усилении синтеза кортикостероидов в период стимуляции надпочечников используется главным образом холестерин. При образовании кортикостероидов из холестерина последний должен пройти следующие этапы: холестерин \rightarrow 20 α -сиклохостерин \rightarrow 20 α , 22-диоксистерин \rightarrow прегненолон и изокапроновая кислота. Прегненолон подвергается дегидрированию в кольце А и затем гидроксилируется в положениях 21 и 11 при образовании кортикостерона, в 21, 17 и 11 — при образовании гидрокортизона и в положениях 21, 18 и 11 — при образовании альдостерона.

Для изучения последовательности реакций при образовании кортикостероидов большое значение имели опыты с перфузией изолированных надпочечников, в которых испытывались различные предполагаемые промежуточные продукты этого синтеза. Так, было установлено, что из прогестерона в этих условиях образуются 17-оксипрогестерон, кортикостерон и 17-оксикортикостерон. Из 17-оксипрогестерона образуется 17-оксикортикостерон, но не кортикостерон. Дезоксикортикостерон в этих условиях превращается только в кортикостерон и не превращается в 17-оксикортикостерон. Из приведенных данных вытекает, что превращение прогестерона определяется активностью двух ферментов — гидроксилазы С-21 и С-17. Более раннее гидроксилирование у С-21 исключает возможность гидроксилирования С-17, и в этом случае может образоваться только кортикостерон. 17-оксикортикостерон образуется лишь в том случае, когда гидроксилирование С-17 предшествует гидроксилированию у С-21 (через 17-оксипрогестерон). Гидроксилирование же у 11-го углеводного атома, согласно этим данным, возможно лишь после гидроксилирования С-21, так как 11-оксипрогестерона практически не образуется. Все это позволило предложить схему последовательности реакций, обеспечивающих образование кортикостероидов [13], которая с рядом дополнений представлена на рис. 4.

Исследования, посвященные выяснению путей образования альдостерона [14] показали, что его предшественниками могут быть прогестерон, дезоксикортикостерон и кортикостерон. Поскольку при инкубации меченого кортикостерона образуется меченый альдостерон, естественно допустить, что ткань надпочечника способна гидроксилировать кортикостерон

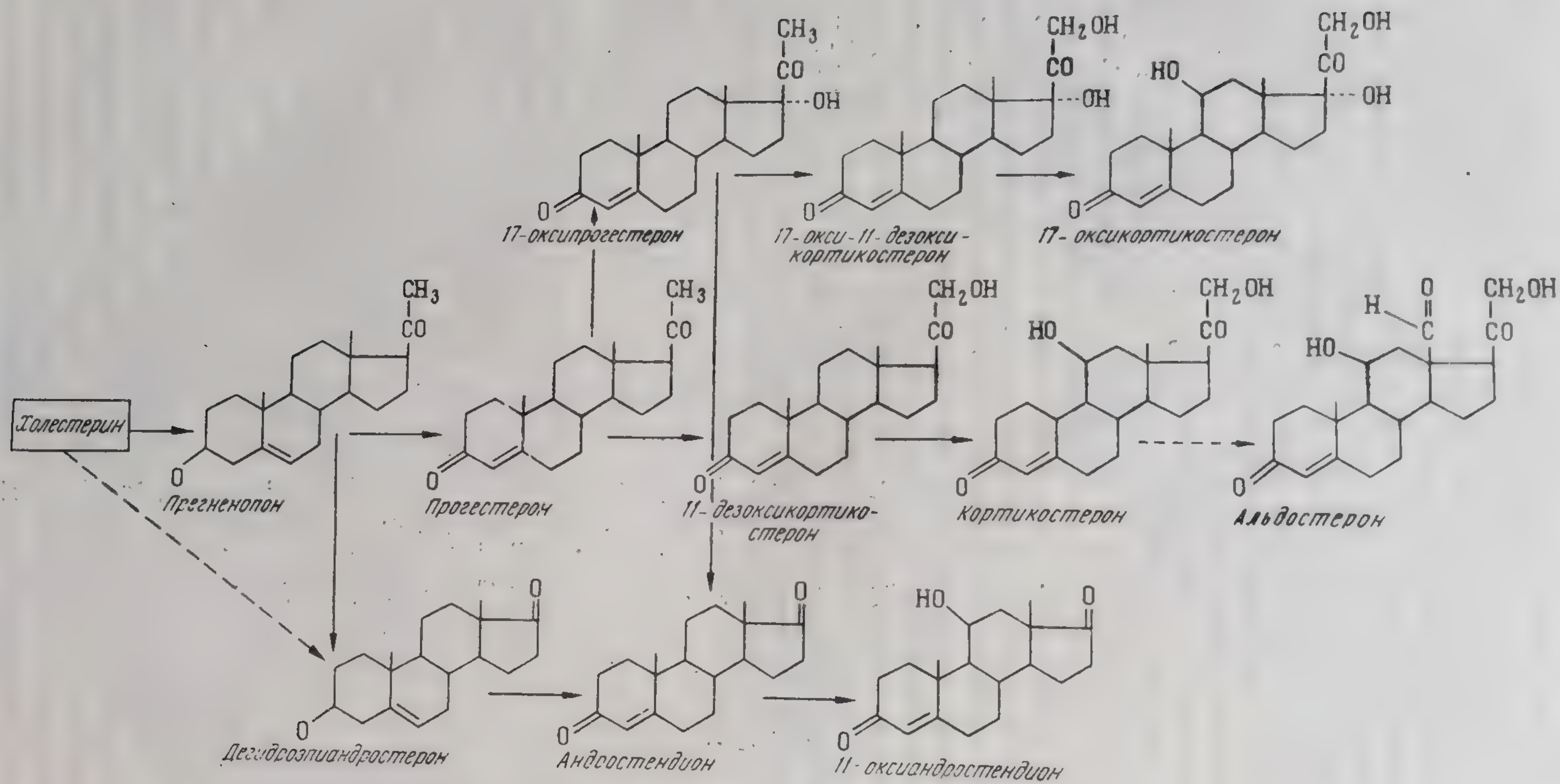


Рис. 4. Схема биосинтеза стероидов коры надпочечников.

в 18-м положении. В настоящее время остается неясным, на какой стадии происходит 18-гидроксилирование при образовании альдостерона из прогестерона. Начинается ли процесс с гидроксилирования прогестерона в 18-м положении или он сначала превращается в кортикостерон, а последний, гидроксилируясь, превращается в альдостерон. То же относится и к дезоксикортикостерону. Поскольку все три субстрата превращаются в альдостерон, в настоящее время не представляется возможным с достоверностью определить последовательность реакций биосинтеза этого стероида. Необходимо отметить, что биосинтез альдостерона осуществляется главным образом, если не исключительно, в клубочковой зоне надпочечников, гидрокортизона — в пучковой, а кортикостерона — частично в пучковой и частично в клубочковой. Оценивая представленную схему биосинтеза кортикостероидов, следует признать, что она в самом общем виде правильно отражает процесс. Вместе с тем, по-видимому, можно ожидать, что в процессе изучения путей биосинтеза кортикостероидов она будет дополняться и видоизменяться. В частности, остается неясным, является ли обязательной стадия образования прогестерона при биосинтезе 17-оксикортикостерона. Так, неоднократно было показано [15, 16], что инкубация срезов надпочечников морской свинки, обычно синтезирующих почти исключительно 17-оксикортикостерон, в присутствии прогестерона приводит к образованию значительных количеств кортикостерона. Превращение холестерина в кортикостероиды доказано с несомненностью, однако не установлено, что во всех случаях образование кортикостероидов идет через холестерин. Совершенно неизвестна природа предшественников кортикостероидов и особенно андрогенов при образовании их из ацетата.

О биосинтезе в надпочечниках андрогенов известно мало. Было показано, что андростендион и 11-оксандростендион могут синтезироваться *in vitro* надпочечниками свиней и коров. При инкубации надпочечников больной с адреногенитальным синдромом, кроме того, был выделен дегидроэпиандростерон. В качестве исходного субстрата использовался меченый C^{14} -ацетат или прогестерон. Интересно отметить, что при инкубации надпочечников человека наблюдалось заметное усиление синтеза андрогенов под влиянием АКТГ [17, 9]. О путях биосинтеза в надпочечниках эстрогенов данные практически отсутствуют, если не считать исследований Мейера [18], показавшего, что при инкубации надпочечников быков с 19-оксандростендионом образуется эстрон. 19-оксандростендион образуется из андростендиона и является промежуточным продуктом при образовании эстрогена из андростендиона гомогенатом плаценты [19]. Ферментные системы, обеспечивающие этапы превращения холестерина в кортикостероиды, изучены очень мало, поскольку ни одна из них не была получена в очищенном виде.

В настоящее время лишь в общем виде известны условия действия этих ферментов, а также их распределение в клетке. Так, фермент, обеспечивающий процесс десмолиза холестерина с образованием прегненолона, содержится в митохондриях и в качестве кофакторов требует присутствия АТФ и ДПН. 3 β -оксистероидгидрогеназа, катализирующая превращение 3 β -оксистероидов в 3-оксостероиды, находится в растворимой части клетки и для осуществления действия требует наличия ДПН. Там же находится и фермент изомераза, ускоряющая переброску двойной связи в молекуле стероида (Δ^5 -стероид \rightarrow Δ^4 -стероид). Ферменты 17- и 21-гидроксилирования находятся в микросомах, однако для проявления их активности необходимо присутствие растворимой части клетки, а также ТПНН и кислорода.

Гидроксилирование в 11-м и 18-м положениях обеспечивается ферментами, локализованными в митохондриях. Для проявления активности 11-гидроксилазы необходимо присутствие ТПНН и O_2 .

ДЕЙСТВИЕ АКТГ НА БИОСИНТЕЗ КОРТИКОСТЕРОИДОВ

Еще в 1930 г. американский исследователь Смит показал, что удаление гипофиза приводит к атрофии надпочечников и что эту атрофию можно предотвратить, если гипофизэктомированному животному подсадить удаленный гипофиз.

В 1943 г. американскими исследователями выделен из передней доли гипофиза гормон, получивший название адренокортикотропного (АКТГ). Вскоре после этого было показано, что АКТГ стимулирует биосинтез кортикостероидов в условиях перфузии надпочечников, инкубации срезов и в опытах *in vivo*, причем выход кортикостероидов при перфузии увеличивается под влиянием АКТГ в 10—20 раз, а при инкубации срезов — в 2—5 раз. Изучая действие АКТГ на биосинтез кортикостероидов [20] перфузируемыми бычьими надпочечниками из различных субстратов, авторы заметили, что гормон стимулирует включение метки холестерина в кортикостероиды приблизительно в 18 раз. При использовании прогестерона в качестве субстрата АКТГ не оказывал эффекта на величину его включения в стероиды. Авторы пришли к выводу, что действие АКТГ направлено на ускорение реакции или реакций превращения холестерина в прегненолон и эту реакцию естественно стали считать лимитирующей стадией биосинтеза кортикостероидов из холестерина.

При изучении механизма участия АКТГ в биосинтезе кортикостероидов значительных успехов достиг Хайнес [21]. Для выяснения этого вопроса имели значение несколько полученных ранее факторов. Так, было показано, что стадии биосинтеза кортикостероидов стимулируются восстановленным ТПН. Замечено, что кора надпочечников очень богата ферментами гексозомонофосфатного шунта. Следовательно, в этой ткани глюкозо-6-фосфат должен превращаться главным образом по пути дегидрирования и таким образом приводить к накоплению восстановленного ТПН. Добавление глюкозо-6-фосфата, как и следовало ожидать, стимулировало биосинтез кортикостероидов.

Можно было предполагать, что и добавление гликогена будет стимулировать биогенез кортикостероидов. Однако это предположение не подтвердилось. Вместе с тем, если гликоген добавляли одновременно с препаратом фосфорилазы печени, наблюдалась стимуляция образования стероидов. Из этих наблюдений был сделан вывод, что надпочечники характеризуются низким уровнем фосфорилазы и что АКТГ, по-видимому, контролирует активность данного фермента. Прямые опыты с инкубацией срезов надпочечников показали, что добавление АКТГ быстро приводит к активации фосфорилазы.

На основании указанных исследований была создана следующая теория механизма действия АКТГ на биосинтез кортикостероидов: АКТГ активирует фосфорилазу, вследствие чего ускоряется превращение гликогена в глюкозо-1-фосфат, а последнего — в глюкозо-6-фосфат. В надпочечниках в силу высокой активности дегидрогеназ значительная часть глюкозо-6-фосфата превращается по пути дегидрирования, что приводит к накоплению восстановленного ТПН и стимуляции синтеза кортикостероидов. Дальнейшие исследования показали, что действие АКТГ на фосфорилазу не является прямым, а осуществляется через стимуляцию образования аденозин-3,5-монофосфата (см. формулу, рис. 5).

Достоверность фактов, на которых базируется изложенная теория действия АКТГ, по-видимому, не вызывает сомнений, однако, как нам кажется, она не может объяснить всех изменений, происходящих в надпочечниках в результате действия АКТГ. Прежде всего упомянутая теория находится в противоречии с более ранними данными о том, что АКТГ действует

на стадии холестерин→прегненолон. Исходя из последней теории, АКТГ принимает участие восстановленный ТПН, и в первую очередь — стадии гидроксилирования в 11-м, 17-м и 21-м положениях. Отсюда АКТГ должен стимулировать биосинтез из прогестерона. Если не допускать каких-то ферменты биосинтеза кортикостероидов, нельзя понять, почему повторные введения АКТГ приводят к тому, что надпочечник обогащается ферментом — 17-гидроксилазой и начинает синтезировать 17-оксикортикостерон вместо кортикостерона.

Ни представления о действии АКТГ на стадии холестерин→прегненолон, ни теория действия через накопление ТПН не могут объяснить, почему АКТГ, стимулируя биосинтез кортикостерона и 17-оксикортикостерона, очень слабо влияет на биосинтез альдостерона, хотя он образуется теми же путями и из тех же предшественников, что и названные стероиды. Несомненно, существующие данные о роли АКТГ в деятельности надпочечников, по-видимому, освещают лишь часть многообразного действия этого гормона на обмен желез в целом и на ферменты, принимающие участие в биогенезе стероидов, в частности.

ОСНОВНЫЕ ПУТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ КОРТИКОСТЕРОИДОВ В ОРГАНИЗМЕ

Теперь известно, что подавляющее количество образующихся в организме стероидных гормонов выделяется в измененном виде, причем метаболиты оказываются сходными, если они даже возникли из различных стероидов. Судьба образующихся эндогенно, а также вводимых с лечебной целью кортикостероидов интенсивно изучалась в последние годы с помощью меченых C^{14} в 4-м положении соединений [5]. Поскольку эти данные в первую очередь интересовали клиницистов, упомянутые исследования проводились на людях-добровольцах. Изучение касалось главным образом двух природных соединений — гидрокортизона и кортикостерона. Чтобы не изменять характер метаболизма стероида нагрузкой последнего, соединение вводили в следовых количествах. Относительно гидрокортизона было установлено, что при внутривенном введении уже через 15—20 минут в крови остается не больше 15% введенной дозы. Расчеты показывают, что полупериод жизни гидрокортизона в крови измеряется 80—90 минутами. Причем, в крови уже через 15 минут появляются соединения меченого стероида с глюконовой кислотой. Через 2 часа количества свободного и связанного стероида становятся одинаковыми.

В моче после внутривенного введения гидрокортизона уже через 2 часа обнаруживается около 11—14% введенной дозы. За 48 часов до 90% выделяется с мочой и лишь 4—5%, а по некоторым данным около 10%, — с калом. Из выделяемого с мочой гидрокортизона неизменный гормон составляет не более 1—3%. Свободные соединения (неконъюгированные), в том числе и неизменный стероид, составляют в различных случаях не более 3%. Основная же масса метаболитов гормона выделяется в виде эфира глюконовой кислоты.

Поведение в организме другого природного кортикостероида — кортикостерона несколько отличается от гидрокортизона. Прежде всего он почти

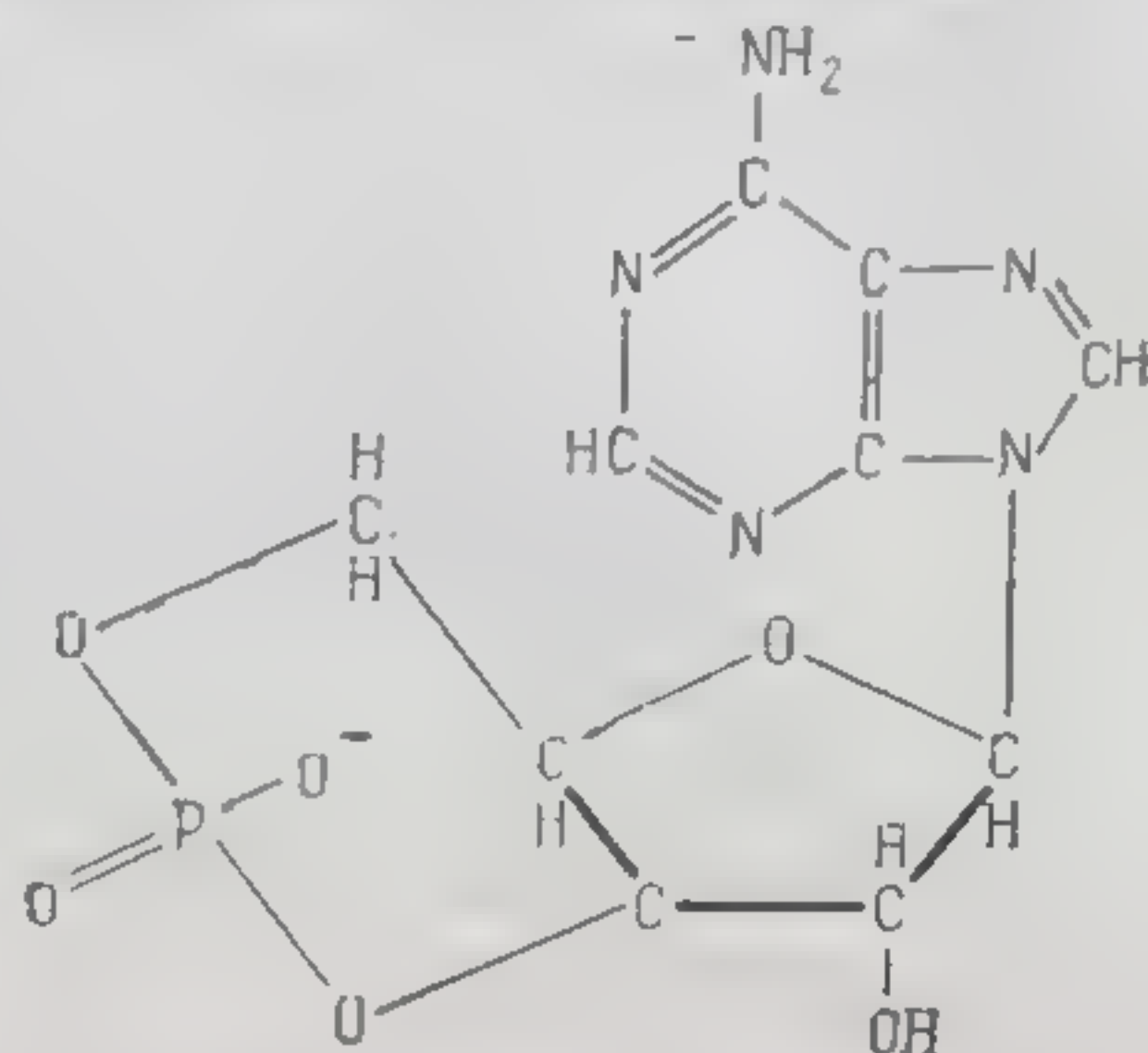


Рис. 5. Формула аденозин-3, 5-монофосфат

в 2 раза быстрее исчезает из кровяного русла. Соответственно в 2 раза быстрее наступает максимум содержания конъюгированных стероидов. Около 75% выделяется за 48 часов с мочой и значительно большее количество, чем для гидрокортизона, достигающее 20—30% введенного стероида, обнаруживается в желчи. Относительно превращения в организме третьего стероида — альдостерона — имеется пока мало данных, хотя известно, что он, как и другие кортикостероиды, подвергается восстановлению и образует эфир с глюкуроновой кислотой.

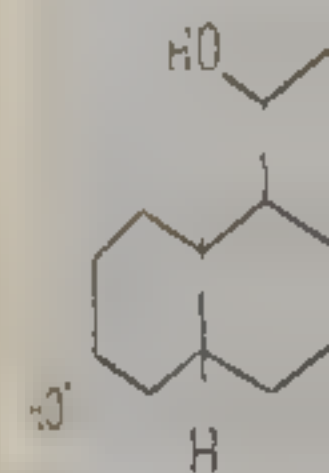
Как уже указывалось, приведенные данные получены при изучении выделения стероидов у людей. Следует указать, что у отдельных видов животных пути циркуляции и выведения стероидов различны и отличаются от таковых, известных для человека. Так, например, у крыс введенный стероид в основном выделяется через кишечник [22, 23]. Было показано, что через 3 часа после подкожного введения стероида 83% дозы выводится в составе желчи. Вместе с тем только 66% стероида обнаруживается в кале и около 30% в моче. Следовательно, имеет место вторичное всасывание из кишечника в кровь. После перевязки желчного протока 90% введенного гидрокортизона обнаруживается в моче. Кишечник является основным путем выделения стероида также и у мышей. При этом нужно отметить, что основная масса гидрокортизона, по крайней мере у крысы, выделяется в течение одних суток. Метаболиты стероидов, выделяемые печенью, находятся в связанном состоянии.

Однако, по-видимому, в кишечнике они подвергаются гидролизу, поскольку моча и кал содержат значительное количество неконъюгированных соединений (от 30 до 50%).

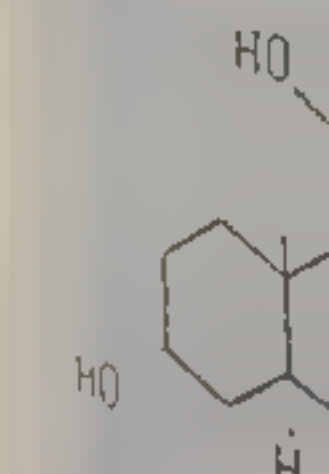
Важно отметить, что у крысы глюкуроновая кислота не принимает участия в образовании парных соединений, так как гидролиз β -глюкуронидазой не приводит к освобождению стероидов. Вместе с тем по крайней мере часть конъюгатов легко гидролизуется кислотой. По-видимому, эти соединения являются эфирами серной кислоты. У такого животного, как морская свинка, около 65% введенного стероида попадает в желчь. Основным же путем выведения стероидных гормонов у этого вида животных являются почки, так как 70—75% введенного гидрокортизона открывается в моче. Из стероидов мочи и кала около 27% находится в свободном виде и около 11—14% связано с глюкуроновой кислотой. Очевидно, образование этих парных соединений происходит вне печени. Поскольку среди стероидов, выделяющихся у морских свинок и крыс с желчью, не имеется глюкуронидов, возможно, что они образуются в кишечнике за счет бактерий. До 30% стероидов мочи и кала освобождается в результате гидролиза кислотой. Остальная часть стероидных соединений, как и при исследовании образцов мочи крысы, остается невыясненной.

Мы уже указывали, что при введении в организм человека гидрокортизона не больше 1% гормона выводится в неизмененном виде. Все или почти все стероиды, выделяющиеся в виде эфиров глюкуроновой кислоты, предварительно подвергаются изменениям. Эти изменения касаются кольца А, в котором происходит восстановление 3-го, 4-го и 5-го углеродных атомов. Поскольку у человека основная масса кортикостероидов выделяется в виде эфира глюкуроновой кислоты, образующегося после восстановления стероида, указанный тип метаболизма следует считать главным. Соединения, возникающие в результате восстановления кольца А стероида, получили название тетрагидростероидов. Тетрагидрокортизон и тетрагидрокортизол, по последним данным [24], составляют до 50% введенного гидрокортизона. Кроме кольца А, восстановлению может подвергнуться и боковая цепь. В этом случае образуются соединения, носящие название кортол и кортолон (рис. 6). Подобных соединений образуется около 25%.

При
Водород
форма) и
зается 5
и гидрокс



гидрокортизон



гидрокортизон

Рис.

типа С
цепи. Г
обсужд
роидов
гидрокс
водород
ся к эт
зующи
новом
ложени
окисле
ствуют

При восстановлении кольца А образуются два оптических изомера (форма) и в α -положение (trans-форма). В преобладающем количестве образуется 5 β -изомер. Принципиально другим путем метаболизма кортизона и гидрокортизона является превращение их в 17-кетостероиды, соединения

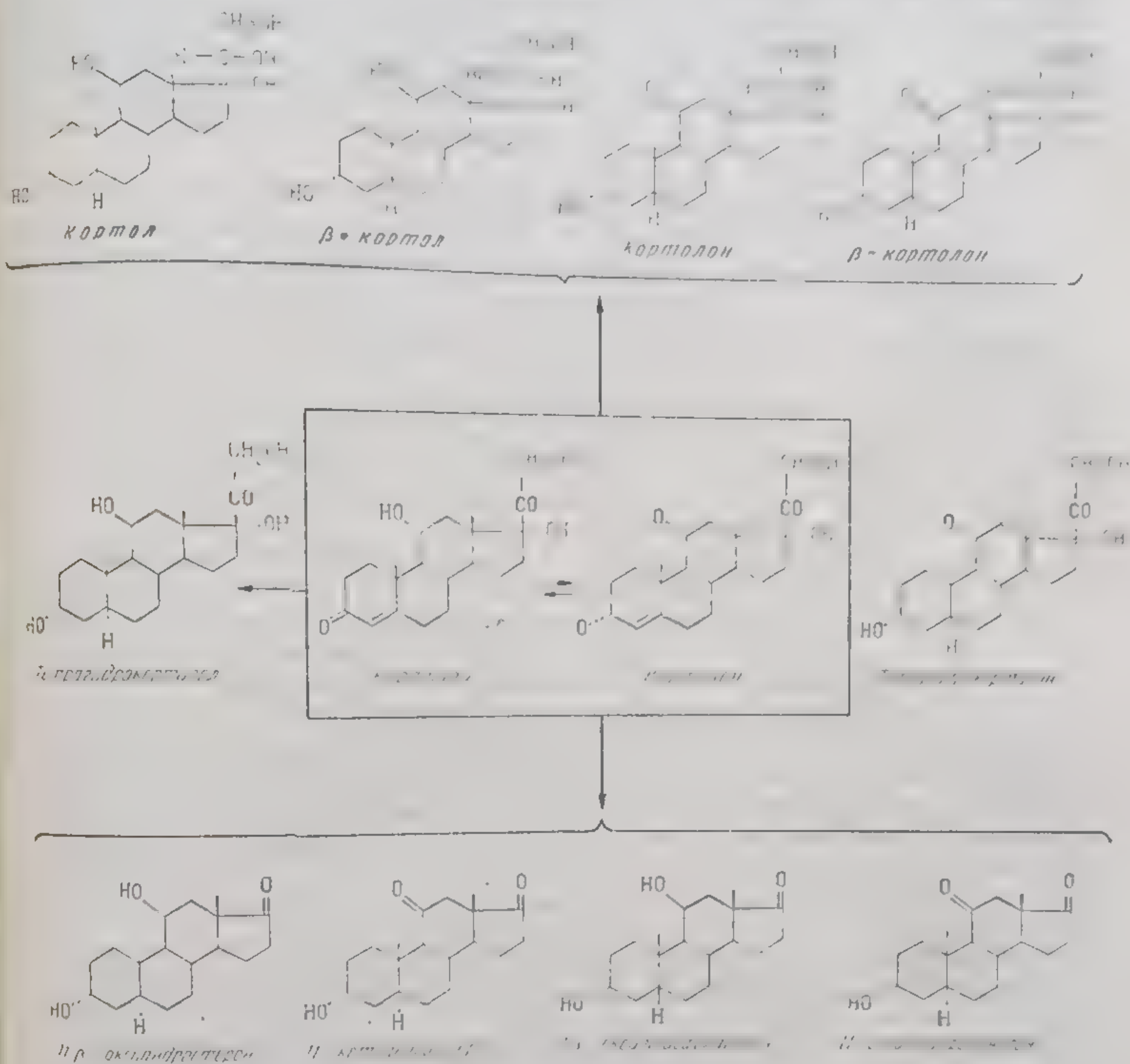


Рис. 6. Основные соединения, образующиеся из гидрокортизона в организме.

типа C_{19} . Это превращение связано с окислительным отщеплением боковой цепи. Подобным образом превращается, по-видимому, не больше 5–8% обсуждаемых стероидов. Отличительной чертой этой фракции 17-кетостероидов является наличие в их молекуле в 11-м положении кислорода или гидроксила. Кроме того, эти 17-кетостероиды в основной своей массе имеют водород у 5-го углеродного атома в β -положении и, следовательно, относятся к этиохолановому ряду. Этим они отличаются от 17-кетостероидов, образующихся из адреностерона и 11-оксиандростендиона, являющихся в основном 17-кетостероидами андростеронового ряда (5α). Различие в расположении водорода у 5-го углеродного атома, наблюдаемое у продуктов окисления гидрокортизона (C_{21}) и 11-оксиандростендиона (C_{19}), свидетельствует о том, что восстановление кольца у гидрокортизона предшествует

окислению боковой цепи, влияющей каким-то образом на восстановление кольца А.

Относительно другого стероида, секретируемого надпочечником человека, кортикостерона, известно, что он может превращаться, так же как гидрокортизон в кортизон, в дегидрированную форму—11-дегидрокортикостерон. Оба эти стероида восстанавливаются в кольцо А и образуют тетрагидроформы. Частично они могут превращаться и по линии восстановления боковой цепи. Однако ни кортикостерон, ни 11-дегидрокортикостерон не образуют 17-кетостероидов, так как соединения, не имеющие гидроксильной группы в положении 17, в заметных количествах не окисляются в организме с потерей боковой цепи.

В очень малых количествах у здоровых людей и в значительных количествах при патологии надпочечников может секретироваться 11-дезоксикортикостерон. Этот стероид, как и другие ранее описанные, превращается в соответствующую тетрагидроформу и этот путь превращения является основным. Кроме того, поскольку этот стероид имеет в 17-м положении гидроксильную группу, окисление его боковой цепи приводит к образованию 17-кетостероидов, андростерона и этиохоланолона. Причем, эти 17-кетостероиды не имеют кислорода в 11-м положении и в этом отношении не отличаются от 17-кетостероидов, возникающих из различных стероидов типа C_{19} . Необходимо только отметить, что в этом случае в преобладающем количестве образуется этиохоланолон.

Хорошо известный стероид 11-дезоксикортикостерон, по-видимому, не относится к числу стероидных гормонов коры надпочечников, поскольку у здоровых людей и животных он не секретируется в заметных количествах. Вместе с тем этот стероид использовали, а частично используют и теперь с лечебной целью. В связи с этим изучались и пути его превращения. Как и для многих других стероидов основной путь его метаболизма связан с восстановлением кольца А и боковой цепи. Восстановление кольца А приводит к образованию тетрагидродезоксикортикостерона. Частичное восстановление боковой цепи может привести к образованию прогестерона. Дальнейшее восстановление боковой цепи наряду с восстановлением кольца А приводит к образованию прегнандиола. Последний, как известно, образуется в организме, кроме того, из гормона желтого тела — прогестерона.

При изучении метаболизма кортикостероидов у различных животных следует иметь в виду возможность других путей превращения, чем это описано для человека. Так, у морской свинки практически не открываются стероиды с восстановленным кольцом А. Вместе с тем обнаруживаются стероиды с дополнительным гидроксильным у 2- или 6-углеродного атома и восстановленной боковой цепью [25, 26].

Как у человека, так и у животных основным местом превращения стероидов является печень. Указанные пути изменения стероидов удается наблюдать и в опытах.

ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ НЕЙТРАЛЬНЫХ 17-КЕТОСТЕРОИДОВ

17-кетостероиды представляют собой продукты превращения (за исключением дегидроэпиандростерона) стероидов, образующихся в надпочечниках и семенниках, причем $\frac{2}{3}$ 17-кетостероидов образуется из стероидов надпочечников. Структурные формулы 17-кетостероидов, обнаруживаемых в моче, представлены на рис. 7.

Основными стероидами, составляющими фракцию 17-кетостероидов, являются: дегидроэпиандростерон, андростерон, этиохоланолон и, кроме того, 11-окси- и 11-кетоандростерон и 11-кето- и 11-оксиэтиохоланолон.

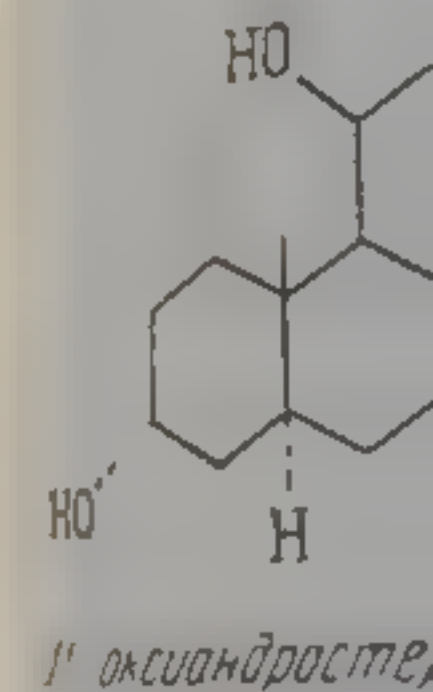
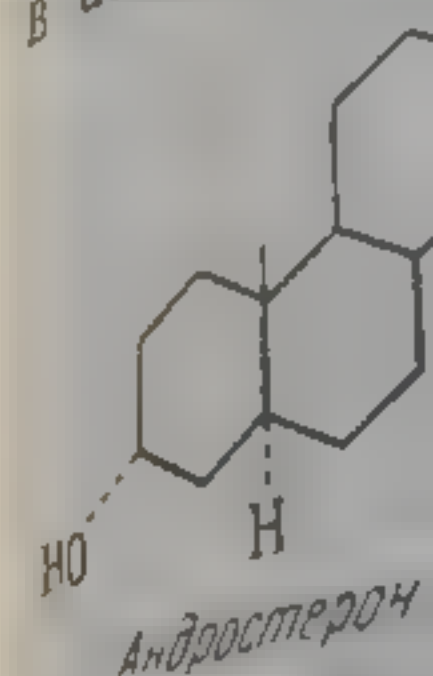


Рис. 7

17-кетостероиды
суточная экскреция
гормонов надпочечников
всего ряда андростероидов
соотношение андростерона
и андростерона
меняется в зависимости
от пола, возраста, питания
и т.д. Так, у новорожденных
фрагментация андростерона
известно, является основной
пути (без участия 11-кетостероидов)
общей экскреции андростерона
логии [27].

Считают, что у новорожденных
6 мг, а у взрослых (40 лет)
12 мг в сутки. У здоровых
величины экскреции андростерона
растет с возрастом. У мужчин
к 12 годам она незначительна
мужчин экскреция андростерона
медленно увеличивается с
12-летним возрастом.

Теперь известно, что дегидроэпиандростерон, составляющий 10—15% от общего количества 17-кетостероидов, образуется в надпочечниках. Андростерон и этиохоланолон, в нормальных условиях выделяющиеся приблизительно в равных количествах и в сумме составляющие более половины общего количества 17-кетостероидов, образуются из дегидроэпиандростерона, Δ^4 -андростен-3,17-диона (синтезируемых в надпочечнике) и из тестостерона; 17-оксипрогестерон и 17-окси-11-дезоксикортикостерон в очень малой степени превращаются в этиохоланолон и в еще меньшей — в андростерон.

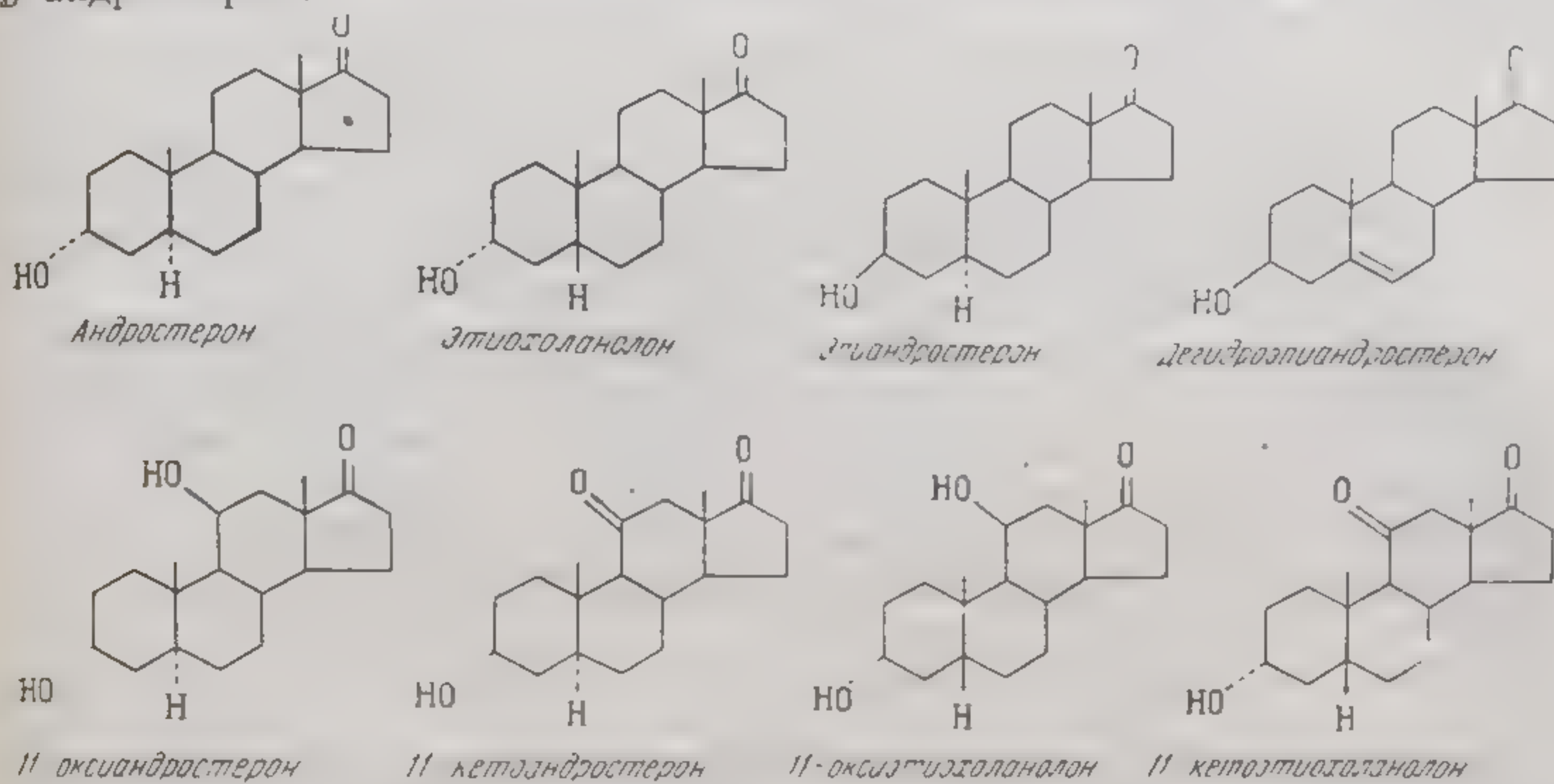


Рис. 7. Основные соединения, составляющие группу 17-кетостероидов.

17-кетостероиды, имеющие кислородную функцию в 11-м положении, суточная экскреция которых составляет около 2 мг, образуются из стероидов надпочечникового происхождения, причем стероиды этиохоланолонового ряда в большей степени являются метаболитами гидрокортизона, а андростеронового ряда — метаболитами 11-оксиандростендиона. Указанное соотношение отдельных компонентов фракции 17-кетостероидов сильно меняется при заболеваниях надпочечников.

Так, например, при опухолях надпочечников резко увеличивается фракция 3β -17-кетостероидов, основным компонентом которой, как известно, является дегидроэпиандростерон. При синдроме Иценко — Кушинга (без опухоли надпочечника) увеличение касается главным образом фракции 11-кето- и 11-окси-17-кетостероидов. Имеется значительное число данных об экскреции 17-кетостероидов в норме и при различных видах патологии [27].

Считают, что нижняя граница нормальной экскреции у мужчин равна 6 мг, а верхняя граница — 25 мг [28]. Для женщин того же возраста (20—40 лет) суточная экскреция 17-кетостероидов выражается величинами 7—12 мг в сутки. Однако колебания в пределах 3—20 мг также возможны у здоровых женщин. Дорфман и Шиплей [27] приводят в качестве средней величины экскреции для женщин 11,8 мг в сутки. Весьма характерно меняется величина экскреции 17-кетостероидов с возрастом. До 6-летнего возраста у девочек и мальчиков уровень экскреции не превышает 3—4 мг. К 12 годам экскреция достигает приблизительно 10 мг, причем у мальчиков она несколько выше, чем у девочек. Максимальной величины экскреция у мужчин и женщин достигает в 25-летнем возрасте, после чего начинается медленное падение; в 80-летнем возрасте она становится равной экскреции 12-летнего возраста.

Уровень экскреции 17-кетостероидов несколько выше в часы бодрствования, чем в часы сна. Всякого рода состояния напряжения (стресс) характеризуются повышением экскреции 17-кетостероидов, однако это повышение значительно менее выражено, чем наблюдаемое в этих случаях повышение выделения кортикостероидов. Не было найдено каких-либо существенных отклонений в секрети 17-кетостероидов при ревматоидных артритях. При циррозах печени, как правило, наблюдается уменьшение экскреции 17-кетостероидов, поскольку замедляются процессы их образования в печени.

Мы остановились лишь на некоторых вопросах биохимии и физиологии кортикостероидов, охватывающих биосинтез, секрецию и превращение их в организме. В литературе существует огромное количество данных об изменениях в обмене веществ под влиянием кортикостероидов и о их лечебном действии при различных заболеваниях. Однако изложение этих данных потребовало бы дополнительно нескольких лекций.

Сравнительно новым и несомненно перспективным является интенсивно изучаемый в настоящее время вопрос о связывании стероидных и других гормонов особыми фракциями белков. Поскольку условия связывания гормонов могут меняться, особенно при заболеваниях, а само связывание отражается на физиологической активности гормонов, этот процесс, по-видимому, следует рассматривать как часть гормональной регуляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Core E. Brit. Med. J., 1959, No 5138, 1620.
2. Lombardo M., McMorris, C. Hudson P. Endocrinol., 1959, 65, 426.
3. Neher R., Meystre C., Wettstein A. Helv. chim. Acta., 1959, 42, 132.
4. Coopage W., Grant W., Liddle G. J. clin. Endocr. 20, 729, 1960.
5. Peterson R. Rec. Progr. Horm. Res., 15, 231, 1959.
6. Kass E., Hechter O., Machi Y., Mou T., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 583, 1954.
7. Юдаев Н. А., Панков Ю. А., Сурикова И. П. Пробл. эндокринологии и гормонотерапии, т. 3, № 1, 20, 1957.
8. Grant J., Symington T., Duguid W. J. clin. End. 17, 933, 1957.
9. Short R. Biochem. Soc. Symposia, No. 18, 59, 1960, Cambridge.
10. Beall D. Nature, 144, 76, 1939.
11. Bulbrook R., Greenwood F. Brit. Med. J. 1, 662, 1957.
12. Baltour W., Comline R., Short R. Nature, 180, 1480, 1957.
13. Hechter D., Pincus G. Physiol Rev. 34, 459, 1954.
14. Ayres P. J. Biochem. Soc. Symposia, No 18, 50, 1960.
15. Крехова М. А. Пробл. эндокрин. и гормонотерапии, т. 2, № 6, 44, 1956.
16. Юдаев Н. А., Родина А. И. Вопросы мед. химии, т. 4, № 3, 213, 1958.
17. Bloch E., Dorfman R. Pincus G. J. Biol. Chem., 224, 737, 1957.
18. Meyer A. Biochim. biophys Acta 17, 441, 1955.
19. Longchamps J., Gual C., Ehrenstein M., Dorfman R. Endocrinol. 66, 416, 1960.
20. Stone D., Hechter O. Arch. Biochem. Biophys 51, 457, 1954.
21. Haynes R., Sutherland E., Rall T. Rec. Progr. Horm. Res. 16, 121, 1960.
22. Bocklage B., Doisy E., Elliot W., Doisy E. J. Biol. Chem. 212, 935, 1955.
23. Wyngaarden J., Peterson R., Wolff A. J. Biol. Chem. 212, 963, 1955.
24. Fukushima D., Bradliw L., Hellman L., Zumoff B., Gallagher T. J. biol. Chem. 235, 2246, 1960.
25. Burstein S. J. Am. Chem. Soc. 78, 769, 1956.
26. Burstein S., Dorfman R. J. Biol. Chem., 213, 581, 1955.
27. Dorfman R., Shipley R. The androgens, 1956, N. Y.
28. Mason H., Engstrom W. Physiol Rev. 30, 321, 1950.

ГЛАВА X

ВОПРОСЫ ПАТОЛОГИИ ОБМЕНА БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ

1. НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПАТОЛОГИИ ОБМЕНА АМИНОКИСЛОТ

С. Я. Капланский

Бурное развитие биохимических исследований в течение двух последних десятилетий особенно проявилось в области изучения обмена аминокислот, исследования роли их в питании людей и различных видов животных, выяснения возможности применения их для парентерального питания и в качестве лечебных препаратов. За этот период было уточнено число аминокислот, незаменимых в питании людей и отдельных видов животных, установлены потребности в каждой из них и в основном изучены пути обмена почти всех аминокислот и промежуточные продукты этого обмена.

Результаты этих исследований в свою очередь дали возможность выяснить значение нарушений процессов обмена отдельных аминокислот в патогенезе различных заболеваний. В настоящее время имеются многочисленные данные, свидетельствующие о том, что образование некоторых ненормальных продуктов этого обмена или накопление в избыточном количестве нормальных продуктов оказывает существенное влияние на функцию различных органов и организма в целом. Для иллюстрации данного положения достаточно указать на данные о влиянии серотонина [1, 2] — продукта обмена триптофана, или γ -аминомасляной кислоты — промежуточного продукта обмена глутаминовой кислоты на деятельность нервной системы [3, 4], а также гистамина, образующегося из гистидина [5], на функцию желудочно-кишечного тракта и ряда других органов.

В задачу настоящей статьи не входит всестороннее рассмотрение всей проблемы патологии обмена аминокислот. Это невозможно сделать, так как даже для изложения данных относительно обмена одной какой-либо аминокислоты необходимы уже отдельные монографии. Поэтому мы ограничимся изложением и обсуждением лишь некоторых данных как литературных, так и полученных в нашей лаборатории.

В настоящее время можно считать уже бесспорно установленным положение, что для нормального течения процесса новообразования белков в растущем организме и для процесса восстановления белкового состава взрослого организма необходимо наличие в органах и тканях всех аминокислот в определенных соотношениях. Дефицит даже одной из аминокислот лимитирует процесс биосинтеза белков и нарушает нормальное течение обмена не только этой аминокислоты, но и всех остальных. Так, например, при недостаточном поступлении из желудочно-кишечного канала триптофа-

на в организме возникает относительный избыток других аминокислот, которые не могут быть использованы для синтеза белков и подвергаются окислительному дезаминированию и другим превращениям.

В результате в организме накапливается значительное количество промежуточных продуктов обмена аминокислот. С другой стороны, в связи с израсходованием для синтеза белков всего поступающего в ткани организма триптофана уменьшается или совершенно прекращается эндогенное образование из триптофана амида никотиновой кислоты, который входит в состав важнейших окислительных ферментных систем организма.

Если фактором, лимитирующим синтез белков в организме, является недостаток какой-либо другой незаменимой аминокислоты, то в этом случае в тканях возникает относительный избыток триптофана, который подвергается окислению. Образующиеся при этом значительные количества некоторых промежуточных продуктов, как, например, ксантуреновой или 3-оксиантраниловой кислоты [6], могут вызывать серьезные поражения ряда органов и тканей. Необходимо отметить также, что в этом случае из триптофана могут образовываться повышенные количества такого активного прессорного вещества, как 5-окситриптамиин (серотонин), роль которого в патогенезе гипертонических состояний привлекает все большее внимание [2].

Приведенные примеры свидетельствуют о важном значении для нормального протекания азотистого и других видов обмена в организме равномерности поступления из желудочно-кишечного канала в печень и другие органы в определенных соотношениях всех аминокислот, в особенности незаменимых.

В последние годы было показано, что отщепление отдельных аминокислот от белков в пищеварительном канале человека и животных под действием различных протеолитических ферментов происходит неравномерно. Раньше других в кишечнике в свободном виде появляются ароматические аминокислоты и триптофан.

Таким образом, и в норме имеется известный разрыв между временем появления в свободном виде и, следовательно, всасыванием из кишечника отдельных аминокислот; однако этот разрыв при физиологических условиях не превышает 2 часов, что не отражается заметно на аминокислотном составе печени и других органов.

Иначе обстоит дело при некоторых патологических процессах, когда интенсивность расщепления белков в желудочно-кишечном канале в силу ряда причин уменьшается. Разрыв во времени между всасыванием отдельных незаменимых аминокислот может достигнуть в этих случаях 5—6 часов, что влечет за собой изменение в составе свободных аминокислот печени и неминуемо отражается на синтезе в этом органе ряда белков.

Вероятным является, например, предположение, что нарушения в азотистом обмене, часто наблюдающиеся после резекции желудка, являются следствием увеличения разрыва во времени между всасыванием различных аминокислот. Исследования, касающиеся изменения количества и состава аминокислот в крови у больных с полной или частичной резекцией желудка после приема мясной пищи, показали, что у этих больных увеличение общего количества аминокислот в крови достигает гораздо большей степени, чем у здоровых людей, при одновременном резком изменении соотношений между отдельными аминокислотами [7].

Хотя под влиянием пепсина в желудке от белков отщепляются заметные количества лишь тирозина и триптофана, все же выпадение функции значительной части желудка при его резекции серьезно отражается на всасывании аминокислот из кишечника. Это зависит от нарушения процесса перехода пищи в двенадцатиперстную кишку. В норме, как известно,

пища попадает в двенадцатиперстную кишку лишь небольшими порциями, причем комки пищи в достаточной мере разрыхляются в желудке, что способствует быстрому пропитыванию этих комков пищеварительными соками в кишечнике. После резекции желудка, как правило, пища быстро переходит в кишечник, в связи с чем возникает относительная недостаточность протеолитических ферментов в кишечнике.

Время полного расщепления белков заметно увеличивается и, как показали соответствующие исследования, разрыв во времени между всасыванием отдельных аминокислот может увеличиться в 2—3 раза, достигая 6 часов и более. При таком разрыве, как уже указывалось, использование аминокислот в печени и других органах при синтезе белков заметно нарушается, причем образуются повышенные количества ряда продуктов их обмена, часть которых может оказывать на организм патологическое воздействие.

Правильность приведенных выше представлений подтверждается многочисленными данными относительно влияния избыточного введения некоторых аминокислот на процессы азотистого обмена и рост животных.

Было установлено, например, что избыточное введение с пищей даже незаменимых аминокислот не только не ускоряет роста животных, но, наоборот, тормозит его, причем одновременно в организме возникают явные симптомы токсикоза.

Так, при избыточном введении крысам и некоторым другим животным метионина или цистина отмечено торможение роста, нарушение функции печени и в конечном итоге даже гибель животных. Эти явления снимались, если одновременно с указанными аминокислотами вводился аргинин, хотя введение больших количеств одного аргинина также вызывало токсические явления. Достаточно убедительно показано, что токсичность больших доз глютаминовой кислоты может быть предотвращена одновременным введением других аминокислот. Об антагонистическом действии фенилаланина и тирозина и некоторых других аминокислот можно судить по результатам исследований Эльведжема с сотрудниками [8].

Интересные данные получены при изучении влияния добавок различных аминокислот к почти чисто рисовой диете, широко распространенной в Бирме, Индии и других странах Азии. Было известно, что такая диета способствует развитию ожирения печени, а затем и цирроза. Добавление к этой диете лизина предотвращало ожирение печени, но зато резко тормозило рост организма. Устранить торможение можно было одновременным добавлением к диете с лизином лейцина, изолейцина, гистидина и валина, но не других аминокислот.

Из приведенных выше данных следует, что нарушение нормальных отношений между количеством поступающих в организм и всасывающихся из желудочно-кишечного тракта аминокислот может повести к тяжелым нарушениям общего азотистого обмена в организме и к возникновению некоторых патологических явлений.

К сожалению, до сих пор еще мало известно о нарушениях процессов всасывания отдельных аминокислот при таких заболеваниях, как хронические гастриты, энтериты, колиты и т. д. Это связано с тем, что до недавнего времени мы не располагали достаточно точными и доступными в клинических условиях методами, которые позволяли бы в процессе пищеварения определять изменения в содержании отдельных аминокислот в крови, моче и других жидкостях организма. Такие исследования стали возможны лишь в последние годы благодаря появлению хроматографических методов. Хотя результаты экспериментов в этой области не позволяют еще сделать окончательного заключения о роли в патогенезе различных заболеваний

нарушений во всасывании той или иной аминокислоты, такого рода исследования дают очень много для понимания сущности нарушений в азотистом обмене, возникающих при различных поражениях желудочно-кишечного тракта, и для предотвращения их патологических последствий.

В связи со сказанным необходимо подчеркнуть также то, что нарушения процессов переваривания белков и всасывания аминокислот могут быть следствием не только первичных заболеваний желудочно-кишечного тракта, но и возникать в связи со вторичными функциональными его поражениями. Такие функциональные нарушения наблюдаются, например, при гипопротемиях и анемиях как экзогенного, так и эндогенного происхождения, влекущих за собой изменения в водном обмене и отек слизистой желудка и кишечника, в связи с чем нарушается как секреторная, так и всасывательная функция эпителия, а также функция ряда протеолитических ферментов [9]. Интересно отметить, что одновременно с нарушением функции протеолитических ферментов часто прекращается и образование внутреннего фактора (фактора Касля) в желудке [10, 11]. В этих случаях часто может возникать порочный круг, так как нарушение отщепления и всасывания аминокислот будет усиливать явления гипопротемии и анемии, что в свою очередь вызовет дальнейшее ухудшение функции эпителия желудочно-кишечного тракта. Во многих случаях этот порочный круг можно прервать только путем применения парентерального питания.

Переходя к вопросу о расстройствах обмена аминокислот после их всасывания из желудочно-кишечного тракта, необходимо прежде всего рассмотреть данные о нарушении процесса поглощения аминокислот из крови печенью и другими органами. В норме увеличение содержания аминокислот в результате всасывания из кишечника можно наблюдать только в течение сравнительно непродолжительного времени в крови воротной вены. В периферической же крови даже при помощи весьма чувствительных количественных хроматографических методов часто нельзя обнаружить никакого увеличения количества аминокислот. Это объясняется тем, что в норме все количество поступающих из кишечника в кровь аминокислот очень быстро поглощается печенью и другими органами, причем поглощение происходит против градиента концентрации аминокислот, так как концентрация аминокислот во всех органах по крайней мере в 10 раз выше, чем в крови. Даже после быстрого внутривенного введения значительных количеств аминокислот последние циркулируют в кровеносном русле только в течение 5—10 минут. Всякое увеличение времени этой циркуляции указывает на нарушение способности органов и тканей, в особенности печени, поглощать аминокислоты. Механизм нарушения данной способности в отдельных случаях различен, но какова бы ни была причина, вызывающая понижение способности тканей поглощать аминокислоты, сама по себе длительная циркуляция отдельных аминокислот в крови может вызывать возникновение ряда патологических явлений. Так, например, показано, что длительная циркуляция в крови повышенных количеств тирозина влечет за собой изменение морфологической картины крови, в частности резко выраженную эозинопению. Эозинопения возникает также после введения с пищей больших количеств лейцина или метионина.

Имеющиеся в настоящее время данные позволяют считать, что возникновение такого рода эозинопений связано с тем, что повышение содержания в крови указанных аминокислот вызывает усиление секреции гормонов коры надпочечника. Механизм эозинопении в этих случаях аналогичен механизму эозинопении после введения адренокортикотропного гормона. Имеются также сведения о том, что увеличение содержания в крови некоторых аминокислот, в частности глицина, влечет за собой расширение одних сосудов (коронарных) и сужение других.

Увеличение содержания аминокислот в крови может, конечно, быть следствием не только нарушения способности печени и других органов поглощать аминокислоты. Такое увеличение часто наблюдается и при различных поражениях почек, связанных с нарушением их выделительной способности, а также при ряде патологических состояний, вызывающих в организме усиленный распад белков тканей с последующим переходом освобождающихся аминокислот из тканей в кровь. Эти случаи можно, однако, сравнительно легко дифференцировать от случаев, при которых увеличение содержания аминокислот в крови связано с понижением поглотительной способности печени и других органов.

Поступающие из крови в печень и другие органы аминокислоты частично используются в них для синтеза белков, частично же превращаются в конечные продукты азотистого обмена (мочевину).

Из некоторой части этих аминокислот образуются такие биологически важные продукты, как гормоны (тироксин, трийодтиронин, адреналин, норадреналин и др.), биогенные амины (гистамин, серотонин), пигменты (меланины) и т. д. Соотношение всех этих процессов определяется очень многими факторами и регулируется нервной и эндокринной системами.

Количество исследований, посвященных изучению механизма превращений аминокислот в различных тканях и его нарушениям, достигло к настоящему времени такой величины, что даже для беглого рассмотрения полученных данных потребовалось бы написать несколько томов (см., например, монографию А. Е. Браунштейна «Биохимия обмена аминокислот». М., 1949).

Наиболее часто встречающимися расстройствами обмена аминокислот в печени и других тканях являются нарушения процессов их дезаминирования и переаминирования, связанные с изменениями активности соответствующих ферментных систем. Эти нарушения уже были нами рассмотрены в специальном обзоре [12], посвященном нарушению обмена аминокислот при белковой недостаточности, и поэтому здесь можно ограничиться приведением только некоторых основных данных. Особенно резко нарушается дезаминирование аминокислот в печени при всех патологических состояниях организма, являющихся следствием экзогенной или эндогенной белковой недостаточности. Эти нарушения ведут к резкому уменьшению образования мочевины в печени и соответствующему понижению ее содержания в моче; количество же аминокислот, выделяющихся из организма с мочой, наоборот, резко увеличивается. Нарушение процесса дезаминирования аминокислот в печени при всех заболеваниях, связанных с белковой недостаточностью, обусловлено главным образом уменьшением активности ферментных систем, катализирующих окислительное дезаминирование и переаминирование L-аминокислот. Это уменьшение в свою очередь является следствием быстрого разрушения и недостаточного ресинтеза белков, входящих в состав ферментных систем.

Кроме общего уменьшения активности дезаминирования в печени, при белковой недостаточности наблюдается еще нарушение ряда специфических ферментных систем, принимающих участие в процессах окисления отдельных аминокислот. Так, например, своеобразные нарушения возникают в окислении тирозина, триптофана, фенилаланина и гистидина, причем в результате этих нарушений в организме могут образовываться и накапливаться значительные количества различных патологических продуктов обмена, оказывающих токсическое воздействие на организм в целом.

Очень типичными в указанном отношении являются токсические состояния, возникающие в результате нарушений процессов окисления гистидина и фенилаланина. Установлено, что при белковой недостаточности

ослабляется активность ферментных систем, обуславливающих дезаминирование и последующее разрушение кольца гистидина, но не нарушается и, наоборот, даже несколько усиливается активность ферментов, вызывающих декарбоксилирование гистидина [13]. В связи с этим резко увеличивается образование из гистидина гистамина, а так как активность гистаминазы — фермента, разрушающего гистамин, — при белковой недостаточности также резко снижается, то в организме накапливаются значительные количества гистамина, со всеми вытекающими из этого последствиями. Весьма вероятно, что аналогичные нарушения обмена гистидина лежат в основе ряда аллергических заболеваний, при которых значительный терапевтический эффект оказывают антигистаминные препараты.

Что касается токсического воздействия некоторых продуктов обмена фенилаланина, то их роль была выяснена в связи с изучением патогенеза так называемой фенилпировиноградной олигофрении. При этом заболевании у детей, характеризующемся резким торможением развития мозга, тяжелой умственной отсталостью и рядом токсических симптомов, резко увеличено содержание в крови и выделение с мочой фенилпировиноградной кислоты — продукта дезаминирования фенилаланина. Образование больших количеств фенилпировиноградной кислоты при этом заболевании связано с нарушением превращения фенилаланина в тирозин, который служит продуктом обмена фенилаланина. Вследствие этого в печени и крови накапливаются значительные количества как самого фенилаланина, так и продукта его дезаминирования — фенилпировиноградной кислоты. Устранение из пищи детей фенилаланина и предотвращение тем самым образования и накопления в их организме фенилпировиноградной кислоты приводят к значительному улучшению общего состояния детей, к быстрому улучшению их умственной деятельности и к исчезновению явлений токсикоза. Если детей снова перевести на диету, содержащую фенилаланин, состояние их вновь резко ухудшается, поскольку в крови увеличивается содержание фенилпировиноградной кислоты.

Результаты изложенных исследований бесспорно показывают, что увеличение образования и накопления в организме детей фенилпировиноградной кислоты является непосредственной причиной всего патологического симптомокомплекса при фенилпировиноградной олигофрении.

Н. Е. Озерецковской [14] установлено, что нарушение обмена фенилаланина и образование повышенных количеств фенилпировиноградной, фенилмолочной кислот и других межучточных продуктов ненормального обмена фенилаланина наблюдается и при ряде других заболеваний, в частности при тяжелых алиментарных дистрофиях у детей, возникающих на почве дизентерии или вследствие других причин. Хотя в этих случаях содержание в организме фенилпировиноградной кислоты и других продуктов обмена не достигает такой величины, как при фенилпировиноградной олигофрении, все же оно достаточно велико, что обуславливает появление ряда симптомов интоксикации и угнетение умственной деятельности при тяжелых дистрофиях у детей.

Важная роль нарушения адаптивного образования ферментов, участвующих в окислении тирозина, в накоплении некоторых продуктов его обмена при белковой недостаточности и при отравлении животных четыреххлористым углеродом установлена в нашей лаборатории Ван Чжунь-янем [16].

Очень важные данные получены в последние годы в нашей и других лабораториях по вопросу о роли нарушений обмена триптофана в патогенезе некоторых патологических состояний [15]. Как известно, окисление триптофана в организме протекает с образованием большого числа различных промежуточных соединений, причем в качестве кофакторов в этом про-

цессе принимают участие витамины В₂ и В₆ и ряд других соединений. Недостаточность этих соединений, возникающая, например, при нарушениях питания, некоторых инфекционных заболеваниях, поражениях печени и т. д., легко может привести к резкому уменьшению образования из триптофана таких необходимых для организма соединений, как никотиновая кислота и ее амид и к накоплению в организме ряда промежуточных продуктов — ксантуреновой кислоты, 3-оксиантраниловой кислоты и др. В работах ряда японских авторов [17, 18] показано, что образование повышенных количеств ксантуреновой кислоты может играть большую роль в патогенезе диабета, так как эта кислота оказывает токсическое воздействие на клетки поджелудочной железы, продуцирующие инсулин.

В опытах на животных [19] установлено, что введение другого промежуточного продукта обмена триптофана — 3-оксиантраниловой кислоты вызывает у них возникновение опухолей мочевого пузыря. Таким образом, можно считать, что этот промежуточный продукт обмена триптофана при известных условиях обладает канцерогенным действием.

Большой интерес представляют материалы, свидетельствующие о роли нарушений в обмене триптофана в генезе эпилептиформных судорог, часто возникающих у грудных детей при вскармливании их различными искусственными препаратами. Установлено, что у этих детей значительно повышено образование из триптофана ксантуреновой кислоты и что введение им с пищей 2—6 мг витамина В₆ в день вызывает уменьшение содержания в организме этой кислоты и прекращение судорожных припадков.

В последнее время уделяется много внимания продуктам обмена триптофана, а именно 5-окситриптину, который, как известно, оказался идентичным с прессорным агентом — серотонином. Установлено, что увеличение образования или высвобождения из связанного состояния этого соединения оказывает очень большое влияние на кровообращение, особенно в легких. С другой стороны, показано, что введение в организм животных антагониста 5-окситрипмина 2-метил-3-этилдиметиламиноиндола вызывает у них эпилептиформные судороги и другие симптомы поражения центральной нервной системы. Результаты этих исследований представляют особый интерес в связи с тем, что ряд препаратов, вызывающих уже в очень небольших дозах галлюцинации и другие нарушения функции головного мозга у людей, как, например, лизергиновая кислота или диэтиламиннокага у людей, как, например, лизергиновая кислота или диэтиламиннокага у людей, как, например, лизергиновая кислота или диэтиламиннокага у людей, также, возможно, являются антагонистами 5-окситрипмина.

Как видно из приведенных примеров, число которых можно было бы умножить, нарушения обмена отдельных аминокислот в печени и других органах дали возможность по новому подойти к расшифровке патогенеза многих заболеваний. К числу таких заболеваний относятся, например, раневое истощение или различного рода дистрофии у детей, возникающие на почве неправильного вскармливания или после некоторых инфекционных заболеваний, при которых в организме происходит усиленный распад тканевых белков.

Исследованиями, начатыми нами еще в 1943 г. [20], установлено, что резкое замедление в заживлении ран у больных с явлениями раневого истощения связано с тяжелыми нарушениями в ресинтезе белков в печени и во всех других органах и с очень сильно выраженными изменениями как в общих процессах дезаминирования и синтеза аминокислот, так и в превращениях некоторых отдельных аминокислот. Эти изменения в первый период раневого истощения являются следствием усиления распада белков в организме в результате ранения и нарушения регуляторной функции нервной и эндокринной систем в азотистом обмене. Если в этот период по какой-либо причине не удастся восстановить нормального течения обмена

белков и аминокислот, то у больного развивается гипопроотеинемия, в очень значительной степени возрастает выделение аминокислот с мочой, меняются соотношения в моче конечных продуктов азотистого обмена (мочевины, аммиака, креатинина и др.). В организме происходит накопление ряда патологических продуктов обмена аминокислот, которые, как уже указывалось, могут вызвать явления тяжелой интоксикации организма. Одновременно в связи с гипопроотеинемией и нарушением синтеза и секреции пищеварительных ферментов нарушается расщепление белков пищи в желудочно-кишечном тракте и всасывание аминокислот из кишечника. Это в свою очередь еще более усиливает гипопроотеинемия и все нарушения процессов обмена аминокислот и, таким образом, развиваются те тяжелые явления, которые иногда могут очень быстро привести к гибели больного.

Нормальное течение процессов синтеза белков и обмена аминокислот в большинстве случаев можно восстановить (если не имеется тяжелых, необратимых нарушений функций печени) парентеральным введением сыворотки крови или гидролизатов белков, или, наконец, эквилибрированных аминокислотных смесей в количествах, достаточных для покрытия потребности организма в белках и для выравнивания нарушенных соотношений между отдельными аминокислотами в печени и других органах. Необходимо отметить, что в некоторых случаях введение гидролизатов белков или аминокислотных смесей более эффективно, чем введение сыворотки или различных белковых препаратов. Это можно объяснить тем, что при введении белков сыворотки они превращаются в белки печени без предварительного глубокого расщепления до аминокислот [21], в связи с чем в известной степени удовлетворяется потребность организма в белках, но не нормализуется соотношение аминокислот и не усиливается процесс синтеза из них белков. При введении же гидролизатов или аминокислотных смесей достигается и та, и другая цель, так как вводимые аминокислоты используются в печени для синтеза белков и одновременно способствуют восстановлению в ней нарушенного соотношения аминокислот.

Если у больного с раневым истощением имеются уже резко выраженные нарушения функции печени и явления жировой ее инфильтрации, то часто можно добиться хорошего терапевтического эффекта, если перед введением белковых или аминокислотных препаратов давать больному внутривенно или через рот значительные количества метионина. На первый взгляд здесь как будто имеется противоречие между сказанным ранее о нарушениях в соотношениях аминокислот в тканях при раневом истощении как об одной из основных причин нарушения азотистого обмена и предложением вводить значительные количества метионина, что должно привести к еще большему сдвигу этого соотношения. Дело в том, что метионин оказывает специфическое влияние на предотвращение дальнейшей жировой инфильтрации печени и развитие циррозов, а также резко повышает ее устойчивость в отношении действия разных токсических агентов и усиливает антитоксическую функцию самой печени. Избыток же вводимого метионина, как показали наши исследования [22, 23], даже при далеко зашедшем состоянии дистрофии в отличие от других аминокислот быстро окисляется в организме. В связи со специфической ролью метионина введение его рекомендуется многими исследователями для ускорения заживления ран и при отсутствии раневого истощения.

Приведенная выше картина нарушений в азотистом обмене характерна не только для раневого истощения, но и для всех патологических состояний, сопровождающихся более или менее выраженной белковой недостаточностью экзогенного или эндогенного происхождения. Она постоянно встречается при всех тяжелых алиментарных дистрофиях у детей, при дистро-

фиях, возникающих на почве дизентерии, или других хронических инфекционных заболеваниях, а также при таком широко распространенном в не-незе которого явления белковой недостаточности выступают на первый план. Применение в этих случаях метионина дает еще лучший эффект, чем при лечении раневого истощения. Это связано с тем, что при указанных заболеваниях нарушения азотистого обмена связаны с поражением ряда функций печени, на которые метионин оказывает специфическое действие.

В наших исследованиях совместно с клиницистами установлено, что введение метионина улучшает состояние детей и с такими формами тяжелых дистрофий, которые не поддаются лечению никакими другими средствами, в том числе и многократными вливаниями сыворотки [24, 25].

Кроме перечисленных, в последние годы выявлены заболевания, в патогенезе которых значительное место занимают нарушения процесса выделения аминокислот, например гепатолентикулярная дегенерация, или болезнь Вильсона. При этом заболевании, основным симптомом которого является дегенерация клеточных элементов печени в сочетании с дегенерацией нервных узлов и ряда участков мозга, значительно нарушен обмен меди в организме. Количество церулоплазмينا — белка сыворотки крови, переносящего медь, уменьшается, а выделение меди с мочой увеличивается. Установлено, что параллельно с увеличением количества меди повышается и выделение аминокислот с мочой. Это объясняется тем, что при болезни Вильсона образуются значительные количества комплексных соединений меди с аминокислотами, которые быстро выделяются почками. Интенсивность образования и выделения больших количеств комплексов зависит от содержания белка в пище. При наличии в пище большого количества белков выделение аминокислот и соответственно меди может в десятки раз превышать норму. При недостатке белков увеличение выделения аминокислот менее выражено, но в этом случае могут быстро возникать явления, характерные для общей недостаточности аминокислот или для дефицита некоторых из них. Необходимо отметить, что некоторое повышение выделения комплексов аминокислот с медью наблюдается и при различных формах циррозов печени, однако оно никогда не достигает такой степени, как при болезни Вильсона. Большой интерес представляет обстоятельство, что различные соединения, также обладающие способностью образовывать комплексы с тяжелыми металлами, как, например, 2—3-димеркаптопропанол (бал), этилендиаминотетраацетат (версен) и др., тормозят образование комплексов аминокислот с медью. Введение их в организм больных болезнью Вильсона не уменьшает выделения меди, но снижает выделение аминокислот с мочой и одновременно значительно улучшает клиническое состояние больных.

В процессе изучения механизма нарушения обмена аминокислот при этом заболевании установлено, что аминокислоты легко образуют комплексы не только с медью, но и с рядом других тяжелых металлов, в частности со свинцом, ураном, плутонием и др., причем образование этих комплексов ведет к извлечению значительного количества аминокислот из общего кругооборота обмена аминокислот и повышению отложения их в некоторых органах, в частности в костной системе. В некоторых случаях это может повести к вытеснению из костной системы соединений кальция. Очень вероятно, что подобный механизм лежит в основе некоторых форм рахита, с трудом или совсем не поддающихся лечению витаминами. Уже сравнительно давно установлено, что увеличение выделения кальция с мочой при указанных формах рахита сопровождается повышением выделения и аминокислот. Возможно, что так же, как при болезни Вильсона, при этих формах рахита в организме детей происходит усиленное образование комплек-

сов аминокислот, но не с медью, а с кальцием, причем, отлагаясь в костной системе, эти комплексы вытесняют нормальные соединения кальция, обуславливая тем самым возникновение симптомов рахита. Необходимо указать также, что комплексы аминокислот с металлами в отличие от свободных аминокислот почти не подвергаются обратному всасыванию в мочевых канальцах, что и обуславливает повышенное их выделение почками.

Выше мы рассмотрели лишь сравнительно небольшую часть полученных к настоящему времени данных о роли нарушений в обмене аминокислот в возникновении тех или иных патологических состояний. Из приведенных примеров, однако, совершенно ясно, что эти нарушения играют большую роль в патогенезе многих заболеваний, чем это предполагалось. Нет сомнения, что дальнейшие исследования в этом направлении позволят выявить и многие другие, до сих пор еще неизвестные клинические проявления нарушений обмена аминокислот и что здесь открывается обширное поле деятельности для совместной координированной работы биохимиков и клиницистов. Развитие таких исследований будет иметь не только большое значение для выяснения генеза различных патологических состояний, но и для дальнейшей разработки вопроса о терапевтическом применении различных аминокислот. Значение последнего вопроса вряд ли нуждается в специальных доказательствах. Достаточно указать на то широкое распространение, которое получили применение метионина для лечения различных поражений печени и для ускорения заживления ран, а также использование глютаминовой кислоты в терапии некоторых поражений центральной и периферической нервной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Могилевский А. Я. Успехи современной биологии, 1960, т. 50, в. 3, 322.
2. Page I. H. *Physiol. Rev.*, 1958, 38, No 2, 277.
3. Владимиров Г. В. и Сытинский И. Л. Успехи современной биологии, 1961, 151, в. 1, 3.
4. Elliot K. a. Jasper H. *Physiol. Rev.*, 1959, 39, No 2, 383.
5. Кырстя М. Д. Успехи современной биологии, 1961, 51, в. 1, 21.
6. Великодворская Г. А. Дисс. М., 1957.
7. Inutsuka. *Bruns Beihage kli. Chirurgil.*, 1956, 193, No 2, 209.
8. Venton D., Nagreg E., Spruey H. *Arch. Biochem. Bioph.*, 1956, 60, No 1, 156.
9. Балаба Т. Я. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1952, 33, в. 1, 37.
10. Гурьева И. П. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1948, 26, в. 1, 47.
11. Гурьева И. П. Вопросы медицинской химии, 1949, 1, 128.
12. Капланский С. Я. Вопросы медицинской химии, 1957, 3, в. 5, 340.
13. Цейтлин Л. А. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1948, 25, в. 4, 380.
14. Озерецковская Н. Е. Дисс. М., 1954.
15. Великодворская Г. А. Вопросы медицинской химии, 1957, 3, в. 4, 292.
16. Ван Чжунь-янь. Биохимия, 1960, 25, в. 1, 118; в. 5, 941.
17. Kotake V. a. Tan S. J. *Biochemistry (Tokyo)*, 1953, 40, 295.
18. Kotake I., Snada T., Matsuhiro J. J. *Biochemistry (Tokyo)*, 1954, 41, 255.
19. Boyland E. a. Watson J. *Nature*, 1956, 177, 837.
20. Капланский С. Я., Болдырева Н. В., Березовская Н. Н. *Хирургия*, 1944, № 5, 3.
21. Кузовлева О. Б. Биохимия, 1954, 19, в. 4, 441.
22. Капланский С. Я., Капанская С. И. Вопросы медицинской химии, 1949, 1, стр. 143.
23. Капланский С. Я., Капанская С. И. и Шмерлинг Ж. Г. Биохимия, 1952, 17, в. 3, 348.
24. Капланский С. Я. Вопросы питания, 1953, 12, в. 1, 5.
25. Капланский С. Я., Озерецковская Н. Е., Ширвиндт Б. Г. Вопросы питания, 1953, 12, в. 6, 21.

2. ФУНКЦИЯ
Лотя с мо
...и му
...сво
...наши
...появляются
...Лишь сравнит
...ки, как бакте
...перутоплазм
...точных белко
...гулирующим
...ями органов
...с другой.
Функция
ления крови
щелочного р
химических,
в 20-х годах.
Результаты
клинической
вестной теор
Что кас
для синтеза
ственного и
ного глубок
этим вопрос
почти ничег
реносчиков
между отде
соединений
Соверш
ющаяся фе
известно, ч
ферментов,
чительных
ствие доста
может быт
тельное зн
считалось,
их из ткан
проникаем
есть. При
чительной
да или не
лительны
тивности
Для ряда
можно бы
Так, нап
ротки то
так как

2. ФУНКЦИИ БЕЛКОВ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

С. Я. Капланский

Хотя с момента появления первых данных о белках сыворотки крови (Либиг и Мюльдер, 1830) прошло уже свыше 130 лет и по вопросам происхождения, свойств и структуры этих белков накопилась громадная литература, наши знания относительно их функции недостаточны. Каждый год появляются все новые и новые важные данные по этим вопросам. Лишь сравнительно недавно были открыты такие функции белков сыворотки, как бактерицидная функция пропердина или ферментативная функция церулоплазмينا. Двадцать же лет назад относительно функции сывороточных белков было известно только то, что они являются фактором, регулирующим водный обмен между кровеносной системой и различными тканями органов, с одной стороны, и защитным фактором (γ -глобулины) — с другой.

Функция альбуминов в регуляции осмотического и онкотического давления крови и тем самым в регуляции обмена ряда электролитов, кислотно-щелочного равновесия и т. д. была выявлена благодаря серии физико-химических, биохимических и физиологических исследований белков в 20-х годах, главным образом в школах Михаэлиса, Гебера, Шаде и др. Результаты этих исследований в свое время получили широкий отклик в клинической медицине и, в частности, они нашли отражение в широко известной теории серозного воспаления Эппингера.

Что касается функции белков сыворотки как источников аминокислот для синтеза белков органов и тканей, а также возможности их непосредственного использования для образования этих белков без предварительного глубокого расщепления до аминокислот, то обоснованные данные по этим вопросам были получены только в сороковых годах. До этого времени почти ничего не было известно о значении белков сыворотки крови как переносчиков углеводов, липидов, пигментов, различных катионов и анионов между отдельными органами и о роли этих белков в обмене указанных соединений.

Совершенно неразработанной долгое время оставалась область, касающаяся ферментативной функции белков сыворотки, хотя уже давно было известно, что многие белки сыворотки обладают этими свойствами и число ферментов, обнаруживаемых в норме в сыворотке в более или менее значительных количествах, достигает большой величины (табл. 1). Отсутствие достаточного внимания к функции белков сыворотки как ферментам может быть объяснено тем, что многие исследователи отрицали самостоятельное значение ферментов крови в общем обмене. До недавнего времени считалось, что активность ферментов в крови отражает степень перехода их из тканей в кровь из распадающихся клеток или вследствие увеличения проницаемости тканей и т. д. Во многих случаях это действительно так и есть. Примером подобного перехода может служить появление в крови значительной ферментативной активности аминсфераз при инфарктах миокарда или некротических процессах в печени, активности амилазы при воспалении или некротических процессах в поджелудочной железе или резкое увеличение активности кислой фосфатазы при поражениях предстательной железы. Для ряда ферментов крови по их отношению к различным ингибиторам можно было даже установить их происхождение из того или иного органа. Так, например, в норме только 10% активности кислой фосфатазы сыворотки тормозится тартратом, т. е. происходит из предстательной железы, так как характерной особенностью фосфатазы именно этой железы является

Перечень некоторых ферментов сыворотки крови,
обладающих ясно выраженной активностью

Аденозиндезаминаза	α -лецитиназы
Аденозинфосфатаза	β -лецитиназы
Алкогольдегидрогеназа	Липаза
Альдолаза	Лизоцим
Алиэстераза	Моноаминоксидаза
Амилаза	5-нуклеотидаза
Аминодипептидазы	Плазмин
Аминотрипептидазы	Просветляющий фактор (липаза липопротейдов)
Аргиназа	Дезоксирибонуклеаза
Гистаминаза	Рибонуклеаза
β -глюкуронидаза	Сульфатазы
Гексозофосфатизомераза	Трансаминаза глютамикопировиноградной кислоты
Гиалуронидаза	Трансаминаза глютамикощавелевоуксусной кислоты
Дегидрогеназа глицероальдегидфосфата	Факторы свертывания крови, находящиеся в сыворотке
Дегидрогеназа глицерофосфата	Фасфатаза кислая
Дегидрогеназа молочной кислоты	Фосфатаза щелочная
Дегидрогеназа лимонной кислоты	Фосфоглюкомутазы
Дегидрогеназа яблочной кислоты	Холинэстераза
Дегидрогеназа-6-глюконовой кислоты	
Дегидрогеназа ксантина	

ее торможение тартратом. При раке же предстательной железы тартратом тормозится уже около 99% этой фосфатазы сыворотки. Точно также при раке грудной железы резко увеличивается активность в сыворотке кислой фосфатазы, резистентной к действию ионов кальция. Этот вид фосфатазы опять-таки характерен для грудной железы, и в норме содержание ее в сыворотке не превышает 10% общей фосфатазной ее активности.

Приведенные выше примеры убедительно показывают, что в норме или при ряде патологических процессов многие ферменты сыворотки появляются в сыворотке крови в связи с их выходом из органов.

В последние годы, однако, получены многочисленные данные, показывающие, что в сыворотке имеются ферменты, которые являются специфическими именно для нее. Кроме различных факторов сыворотки, принимающих участие в процессах свертывания плазмы крови, наибольшее внимание привлекают плазмин и церулоплазмин. Установлено, что плазмин, образующийся из своего предшественника — плазминогена, не только принимает участие в процессе фибринолиза, но действует и на ряд других белков плазмы, причем образуются специфические пептиды — кинины, обладающие свойствами вазодилататоров и оказывающие значительное влияние на кровяное давление. В плазме и сыворотке крови были также обнаружены ферменты, катализирующие расщепление образующихся при действии плазмина кининов (о действии плазмина и об образовании кининов см. обзоры [1, 2, 3]).

Не меньшее, хотя далеко еще не выясненное физиологическое значение, имеет, по-видимому, ферментативное действие такого специфического глобулина сыворотки, как церулоплазмин, который обладает оксидазным действием в отношении ряда биогенных аминов и аскорбиновой кислоты, циркулирующих в крови.

Мы не можем здесь более подробно рассмотреть вопрос о роли ферментативной функции белков сыворотки и ограничимся только указанием, что еще очень многие ферментативные функции белков сыворотки остаются до настоящего времени неизвестными. Это относится и к физиологической роли ряда уже известных ферментов сыворотки.

Переходя к вопросу о роли белков сыворотки как переносчиков различных соединений, необходимо отметить, что все известные в настоящее время фракции белков сыворотки принимают участие в этом процессе. Трудно назвать белок, циркулирующий в кровеносном русле, который не был бы в той или иной степени связан с углеводами, липидами, пигментами или неорганическими элементами. Для некоторых из этих белков связывание определенных соединений является, по-видимому, основной и специфической физиологической функцией. Это относится, например, к гаптоглобину, быстро связывающему гемоглобин, освобождающийся в процессе разрушения эритроцитов.

Для иллюстрации свойства отдельных белков сыворотки более или менее прочно связывать различные соединения приведем данные [4] о содержании в них углеводов при расчете на 100 мл сыворотки. Установлено, что количество углеводов во фракции альбуминов в среднем равно 10 мг, во фракции α_1 -глобулинов — 25 мг, α_2 -глобулинов — 44 мг, β -глобулинов — 30 мг и γ -глобулинов — 10 мг. Для того чтобы стало ясно значение этих цифр, надо указать, что общее содержание, например γ -глобулинов, в 100 мл сыворотки крови человека составляет около 500 мг, причем на это количество приходится 44 мг углеводов (при расчете на глюкозу), что составляет около 9% по весу; если же принять во внимание молярные соотношения, то на каждый моль белка связывается свыше 100 молей углевода.

Еще больше содержится углеводов во фракции преальбуминов сыворотки, которая, как известно, в основном состоит из серомукоидов. При выделении отдельных фракций белков или индивидуальных белков из сыворотки и дальнейшей их очистке различными методами значительная часть связей в комплексах белков с другими соединениями разрывается. Однако даже при самой тщательной очистке тех или иных белков в большинстве случаев не удается получить их совершенно свободными от соединений, ранее входивших в их комплексы. Одно время казалось, что альбумин сыворотки крови можно получить в свободном от других веществ виде. Однако исследованиями Кона [5] и его сотрудников показано, что если альбумин можно очистить от углеводов, то нельзя отделить его от липидов. Более того, при попытке полностью удалить липиды из альбумина последний начинает хуже кристаллизоваться и при содержании липидов ниже известного предела совершенно теряет это свойство. Наоборот, добавление некоторых количеств олеиновой или стеариновой кислоты к растворам этих препаратов альбумина заметно облегчало их кристаллизацию.

О роли альбуминов сыворотки в связывании и переносе липидов можно судить также по следующим данным. Согласно недавно опубликованным данным Гудмана и его сотрудников [6], общее количество жирных кислот в сыворотке крови равно $5 \cdot 10^{-4}$ моля, концентрация же свободных жирных кислот составляет 10^{-8} моля. Разница между общим содержанием жирных кислот в сыворотке крови и содержанием свободных жирных кислот обусловлена тем, что значительная часть находится в комплексе с альбуминами. Следует подчеркнуть также, что альбумины сыворотки являются главными акцепторами для жирных кислот, освобождающихся из липопroteидов хиломикронов или действии на них так называемого просветляющего фактора, т. е. специфической липазы сыворотки.

Содержание углеводов и липидов в отдельных фракциях белков сыворотки в зависимости от питания и других факторов может варьировать в очень широких пределах, достигающих 100% и более, причем не только изменяется количество этих соединений в той или иной фракции, но возможен и переход их из одной фракции в другую. В связи с этим изменяется соотношение между отдельными фракциями липо- и гликопротеидов и происходят сдвиги и в электрофоретической картине белков сыворотки.

В настоящее время можно уже считать вполне обоснованным, что при многих патологических состояниях, когда наблюдаются значительные нарушения электрофоретической картины белков сыворотки, причина этих нарушений заключается не в изменении относительно содержания самих белков, а в изменении их подвижности, что определяется часто характером комплексов белков с углеводами, липидами или неорганическими катионами или анионами. Данное обстоятельство уже неоднократно подчеркивалось нами при объяснении механизма изменений электрофоретической картины белков сыворотки крови при различных патологических состояниях [7], в последние годы это же подчеркивал Чарльвуд [8], а также с несколько иных позиций Г. В. Троицкий [9].

К сожалению, приведенные данные часто не учитываются клиницистами. Последние продолжают трактовать изменения электрофоретической картины сыворотки крови в указанных выше случаях главным образом как следствие изменений в биосинтезе отдельных фракций белков или их распада.

Изменения характера комплексов белков сыворотки при различных заболеваниях оказывает существенное влияние не только на некоторые свойства белков, но и на изменение обмена углеводов и липидов, вступающих в комплекс с этими белками. В зависимости от прочности комплексов и характера их расщепления значительно изменяется и скорость перехода из крови в ткани нейтральных жиров, фосфолипидов, жирных кислот, холестерина, варьирует и степень отложения их в стенках кровеносных сосудов. Это, по-видимому, имеет существенное значение для образования атеросклеротических бляшек при разных формах экспериментального и клинического атеросклероза и возможности их обратного рассасывания.

При анализе многочисленных противоречий в данных разных исследователей о роли количества и качества жиров пищи в генезе атеросклероза легко убедиться, что значительная часть этих разногласий связана с разными подходами исследователей к вопросу. В большинстве случаев изучались только изменения в общем содержании отдельных типов липидов в сыворотке крови и лишь сравнительно редко — изменения в комплексеобразования этих соединений с белками. Даже в тех случаях, когда такие исследования проводились, они, как правило, ограничивались только определением изменений в соотношениях α - и β -липопротеидов или различных фракций гликопротеидов. Вопрос же о характере и составе вновь образующихся комплексов, о прочности связи в них холестерина, жирных кислот и других липидов, быстроте обмена составных частей этих комплексов и прохождении их через мембраны внутренней оболочки стенок сосудов остается до сих пор еще мало изученным. Имеются, однако, все основания полагать, что именно эти последние факторы, а не только количество жиров или природа жирных кислот имеют наибольшее значение в патогенезе атеросклероза.

Не менее важное физиологическое значение имеет и комплексообразование белков с другими соединениями, кроме углеводов и липидов. В некоторых случаях комплексообразование по сути дела определяет возможность обмена того или иного соединения, так как в свободном состоянии эти соединения нерастворимы. Классическим примером такого соединения является билирубин. Образующийся при распаде гемоглобина эритроцитов билирубин в свободном состоянии почти совершенно нерастворим и не мог бы вследствие этого быть перенесенным к печени, где происходят его дальнейшие превращения. Связывание билирубина альбуминами делает возможным не только его выделение вместе с желчью, но предотвращает и токсическое действие. Дело в том, что даже небольшие количества свободного билирубина, растворяющегося в сыворотке крови, оказывают резко выражен-

ное токсическое действие при его проникновении в органы, особенно в мозг. Полное связывание билирубина сначала альбуминами сыворотки с последующим образованием в печени его глюкуронидов предохраняет организм от токсического действия.

Аналогичное значение имеет и связывание специфическими белками сыворотки — трансферрином и церулоплазмином железа и меди. Как известно, соли этих металлов при pH сыворотки трудно растворимы, и только в виде комплексов с указанными белками. Очень важно то обстоятельство, что в норме емкость этих белков в отношении связывания железа и меди не насыщена, в результате чего даже при увеличенном поступлении железа и меди в кровь они быстро связываются белками. Это предохраняет организм от токсического действия даже небольшого избытка ионов металлов, влияющих на функцию многих ферментативных систем крови и тканей.

Связывание ионов железа и меди белками сыворотки, таким образом, имеет решающее значение не только для обмена этих веществ, но отражается косвенным образом и на многих других процессах в организме.

В отношении способности связывать другие катионы и анионы особая роль принадлежит альбуминам. Это хорошо можно проиллюстрировать на примере кальция. Как известно, около половины всего находящегося в сыворотке крови кальция связано с альбуминами. В сыворотке устанавливается определенное динамическое равновесие между связанной формой кальция и его ионизированными соединениями, роль которых в процессе свертывания крови, для проницаемости капилляров, для возбудимости нервной системы и т. д. вряд ли нуждается в особом подчеркивании. Благодаря указанному динамическому равновесию в сыворотке концентрация ионов кальция в норме поддерживается на строго определенном уровне. При уменьшении по тем или иным причинам этой концентрации соответствующее количество кальция отщепляется от альбуминов и переходит в ионизированное состояние.

Обратный процесс имеет место при введении в кровь ионизированных солей кальция. Регуляция концентрации ионов кальция в сыворотке, таким образом, непосредственно зависит от количества находящихся в сыворотке альбуминов и их насыщенности кальцием. Поэтому понятно, что при всех заболеваниях, сопровождающихся действительным абсолютным снижением содержания альбуминов в сыворотке, например при некоторых поражениях почек, автоматически ослабляется и способность организма регулировать концентрацию ионизированного кальция в сыворотке крови. Аналогичную функцию выполняют альбумины сыворотки и в отношении регулирования концентрации ионизированного магния в сыворотке. Кроме кальция и магния, альбумины прочно связывают цинк, свинец, ртуть и ряд других катионов, а из анионов — ацетат, цитрат, бикарбонат, нитрат и т. д.

Из других соединений, связывание которых белками сыворотки имеет большое значение для организма, необходимо указать на образование комплексов белков с гормонами. Особенно много данных опубликовано по вопросу связывания белками сыворотки гормонов щитовидной железы [10].

В настоящее время можно считать установленным, что как тироксин, так и трийодтиронины, секретируемые щитовидной железой, быстро и почти полностью связываются в сыворотке крови тремя фракциями белков, а именно преальбуминами, альбуминами и фракцией, электрофоретическая подвижность которой находится между подвижностью α_1 - и α_2 -глобулинов. Последняя фракция, хотя и находится в сыворотке в норме лишь в

очень небольших количествах, имеет наибольшее сродство к тироксину и, по-видимому, на ее долю приходится основное количество связываемых белками сыворотки гормонов щитовидной железы.

До сих пор еще не выяснено, каким образом комплексообразование с указанными фракциями белков сыворотки отражается на активности тироксина и трийодтиронинов. Однако нет никаких сомнений в том, что оно имеет существенное значение для скорости переноса этих гормонов от щитовидной железы к месту их действия в тканях и для регуляции содержания свободных гормонов в крови.

Не меньшее значение имеет, по-видимому, образование комплексов белков со стероидными гормонами, причем и в этом случае комплексообразование происходит главным образом с альбуминами. В специальном обзоре по этому вопросу, написанном Догхедей [11], приводятся данные, полученные различными методами. Показано, что гидрокортизон при прибавлении в разных концентрациях к сыворотке крови связывается альбуминами на 72—82%. Количество связывающегося в аналогичных условиях кортизона составляет 57—75%, а кортикостерона и дезоксикортикостерона — 83—85%.

Большой интерес представляют недавно опубликованные данные Флорини и сотрудников [12]. Ими показано, что некоторые синтетические производные гидрокортизона, обладающие большей активностью, чем гидрокортизон, связываются альбуминами сыворотки в меньшей степени, чем гидрокортизон. Очень хорошо связываются альбумином сыворотки человека тестостерон и другие андрогены, а также эстрогены. Эстрадиол и эстрон, например, связываются в этих условиях на 98—99%. Следует отметить, что насыщение альбуминов одним каким-либо стероидным гормоном не препятствует связыванию им другого стероидного гормона. Отмечено, что комплексообразование альбуминов со стероидными гормонами в известной степени зависит от pH и влечет довольно значительную затрату энергии, порядка 4,4—6,2 калорий/моль. Кортикостероиды связываются и другими белками сыворотки, причем в сыворотке крови людей, очевидно, присутствует специфический глобулин (во фракции IV₄, по Кону), который обладает значительным сродством к гидрокортизону и кортизону [13]. Способность белков сыворотки связывать кортикостероиды и другие стероидные гормоны может варьировать в значительных пределах при разном состоянии организма и, в частности, резко увеличивается при беременности. По вопросу о физиологическом значении связывания стероидных гормонов белками сыворотки в литературе существуют еще большие разногласия, однако почти все исследователи признают значение этого процесса в регулировании концентрации гормонов в крови. Поскольку связанные с белками гормоны труднее проникают из крови в ткани и, кроме того, обладают гораздо меньшей активностью, чем свободные гормоны или их глюкуроны, связывание их с белками, очевидно, предохраняет организм от ряда нарушений. Эти нарушения неминуемо возникли бы при усиленной секреции гормонов и последующем значительном увеличении концентрации их свободных форм в крови.

Связывание белками сыворотки различных полярных и неполярных соединений может происходить не только в самой крови, но и в тканях. Установлено, что некоторые белки сыворотки, в особенности альбумины, сравнительно легко проникают из сыворотки в ткани различных органов и могут оставаться там довольно значительное время в неизменном виде [14, 15, 16]. Это показано как при помощи иммунохимических, так и флуоресцентных методов. До недавнего времени этому проникновению не придавалось особого значения в отношении воздействия на процессы обмена в тканях.

Однако недавно Клейнбергер и Шоллмейер [17] показали, что альбумины, проникшие в клетки тканей, сохраняют способность связывать различные соединения и тем самым оказывают значительное влияние на некоторые процессы обмена в них. Особенно выраженным это влияние оказалось в отношении процессов окислительного фосфорилирования.

Указанными выше исследованиями установлено, что проникновение сывороточного альбумина в митохондрии мышц и других органов значительно повышает в них интенсивность процессов восстановления дифосфопиридиннуклеотида [ДПН], регенерацию АТФ и повышает скорость процессов окислительного фосфорилирования в целом. Это действие альбуминов зависит от их свойств комплексоваться с некоторыми соединениями, разобщающими дыхание и фосфорилирование. Уже давно известно, что альбумины прочно связывают динитрофенол, разъединяющий дыхание и фосфорилирование. Установлено, что альбумины способны связывать и природные, находящиеся в клетках агенты, разъединяющие дыхание и фосфорилирование, и, таким образом, усиливать интенсивность окислительного фосфорилирования. Как известно, одним из мощных природных разъединяющих агентов является тироксин. Выше мы приводили данные, показывающие, что альбумины сыворотки способны прочно связывать этот гормон. Можно с достаточным основанием считать, что действие альбумина на окислительное фосфорилирование в клетках обусловлено в известной степени этим его свойством.

Как уже указывалось, по свойствам образовывать комплексы с другими соединениями альбумины сыворотки крови отличаются от других белков. По-видимому, это замечательное свойство альбуминов находится в связи с их способностью к изомеризации при изменениях рН. Согласно данным Каруша [18], Фостера [19], Г. В. Троицкого [20] и ряда других исследователей, альбумины сыворотки при физиологических значениях рН находятся только в одной форме, которая в настоящее время обозначается как N-форма. При рН в промежутке между 4 и 3 происходит полная изомеризация альбумина и он образует так называемую F-форму, а при рН ниже 3 он находится только в этой форме. N-форма отличается от F-формы по своей электрофоретической подвижности, растворимости, способности присоединять различные ионы и реагировать с поверхностно активными веществами и, наконец, по скорости денатурации при воздействии мочевины или нагревания.

Изменения всех указанных свойств объясняются тем, что в кислой зоне рН к альбумину присоединяется до 3 протонов, причем происходит разрыв соответствующего числа водородных связей и добавочно освобождается 3 карбоксильные группы.

В настоящее время еще нельзя со всей определенностью сказать, происходят ли подобные изменения альбуминов сыворотки в организме *in vivo*, но ряд косвенных данных указывает на возможность такого рода превращений, особенно при некоторых патологических процессах. Выше уже указывалось, что альбумины сыворотки легко выходят из кровеносного русла и проникают в клетки тканей. Согласно результатам наших исследований [21], количество сывороточных альбуминов в клетках отдельных тканей может составлять значительную часть общего их количества.

Если же принять во внимание, что сдвиги рН в структурных элементах и гиалоплазме клеток в кислую сторону могут достигать гораздо больших величин, чем в сыворотке крови (причем при ряде патологических процессов значения рН в отдельных участках клеток доходят до 5 и ниже), то легко можно допустить, что в этих условиях происходит изомеризация альбуминов со всеми вытекающими из этого последствиями в отношении связыва-

ния различных соединений, в том числе и таких биологически активных, как гистамин, серотонин и т. д.

Выше мы изложили данные о значении отдельных белковых фракции сыворотки крови для связывания и транспорта различных соединений, циркулирующих в крови. Необходимо хотя бы вкратце рассмотреть вопрос о функциях белков сыворотки при различных заболеваниях в связи с изменениями в составе белков крови и о значении этих изменений в патогенезе заболеваний. В многочисленных электрофоретических исследованиях, проводимых в клиниках, как правило, просто констатируются те или иные изменения в соотношениях белковых фракций сыворотки, но не делается даже попытки выяснить роль этих изменений в патогенезе данного заболевания или установить их значение для дальнейшего течения. Как известно, изменения белков сыворотки, обнаруживаемые электрофоретически, в преобладающем большинстве случаев заключаются в уменьшении количества альбуминов и в соответствующем увеличении тех или иных фракций глобулинов. Увеличение количества альбуминов наблюдается сравнительно редко и в настоящее время это увеличение можно считать установленным только при некоторых поражениях печени цирротического характера [22]. При уменьшении содержания альбуминов в сыворотке крови на 40-50% по сравнению с нормой, что нередко наблюдается при ряде заболеваний, онкотическое давление крови значительно понижается, в связи с чем соответствующие количества воды переходят из кровеносного русла в лимфу и внеклеточное пространство тканей. Как в лимфе, так и в интерстициальной жидкости органов в норме находится определенное количество альбуминов сыворотки, концентрация которых при увеличении в этих жидкостях содержания воды уменьшается. Гитлин [23], установил, что в норме концентрация альбуминов в сыворотке крови относится к концентрации альбуминов в интерстициальной жидкости как 5 : 1; при уменьшении же концентрации альбуминов в сыворотке крови на 50% соотношение становится равным 20 : 1. Это обозначает, что концентрация альбуминов во внеклеточной жидкости органов снижается в несколько раз по сравнению с сывороткой, что, естественно, ведет к заметному нарушению водного обмена тканей и электролитного равновесия в них. Таким образом, резкое снижение содержания альбуминов в сыворотке быстро отражается и на процессах обмена в различных органах, особенно в печени, что обычно недостаточно учитывается клиницистами в отношении влияния на дальнейшее течение заболевания.

К сожалению, в клинике очень редко обращают внимание на связь между снижением содержания альбуминов в сыворотке и нарушениями жирового обмена. Как указывалось выше, альбумины являются основными белками, связывающими в сыворотке крови свободные жирные кислоты, что делает возможным перенос их из жировых депо в печень и обратно. При более или менее резком снижении содержания альбуминов этот перенос должен в значительной степени нарушаться, что в свою очередь может вызвать накопление жирных кислот в печени с последующим ее ожирением.

В этом отношении значительный интерес могут представлять исследования относительно связи между изменением содержания альбумина в сыворотке и процессом просветления крови после резкого увеличения количества хиломикронов в крови в связи с приемом жирной пищи. Для нормальной функции липопропротеидной липазы (просветляющего фактора), о котором уже говорилось выше, необходимо, чтобы для освобождающихся при расщеплении хиломикронов жирных кислот в сыворотке имелся бы соответствующий акцептор, т. е. такое количество альбуминов, которое может связать большую часть этих жирных кислот. Можно полагать, что при снижении содержания альбуминов процесс просветления сыворотки будет резко замедляться.

Очень важное значение, по-видимому, имеет нарушение связывания кальция при уменьшении содержания альбуминов в сыворотке. Если принять во внимание, что ионы кальция в основном определяют плотность мембран эндотелия сосудов и, следовательно, их проницаемость для различных соединений, то станет ясно, что изменения соотношений различных форм кальция в сыворотке крови, автоматически возникающие при уменьшении содержания в ней альбуминов, неминуемо должны отразиться не только на обмене воды между кровью и тканью, но и на обмене всех низкомолекулярных соединений, т. е. на обмене аминокислот, сахаров, различных минеральных соединений. Данный вопрос в целом еще не выяснен, и требуются дальнейшие исследования в этом направлении.

Аналогичные исследования, по-видимому, необходимы и для решения вопроса о роли уменьшения количества альбуминов в сыворотке для соотношения в ней различных форм билирубина, дающих прямую и непрямую реакцию ван ден Берга. Как известно, прямую реакцию дают только глюкурониды билирубина, образующиеся в печени; комплексные же соединения билирубина с альбуминами сыворотки, в виде которых билирубин, образующийся в норме при распаде гемоглобина, транспортируется к печени, дают непрямую реакцию. Изменения в соотношении этих форм билирубина зависят таким образом не только от количества поступающих в кровь при различных поражениях печени и желчных путей глюкуронидов билирубина, но и от изменений количества билирубина, связанного с альбуминами. Поскольку при различных поражениях печени содержание альбуминов может как понижаться, так и повышаться, соответственно будет изменяться и количество билирубина, дающего непрямую реакцию. Это обстоятельство опять-таки редко учитывается при обсуждении значения различных форм билирубина для диагностики поражений печени.

Аналогичных примеров можно было бы привести множество, однако сказанного достаточно, чтобы стало ясно, какое большое значение имеет в клинике дальнейшее выяснение связи между изменениями в содержании альбуминов сыворотки крови и возникновением различных патологических симптомов.

Переходя к рассмотрению вопроса об изменении количества других фракций белков сыворотки, необходимо уделить некоторое место изменениям в содержании преальбуминов. Этой фракции белков, движущихся при электрофорезе быстрее, чем альбумины, до недавнего времени уделяли мало внимания. Это объясняется тем, что количество данных белков по сравнению с белками, входящими в другие фракции, сравнительно невелико и в норме не превышает 0,5% общего количества белков сыворотки. Эта фракция в основном состоит из мукопротеидов, представляющих своеобразные комплексы с различными углеводами и в некоторых отношениях заметно отличающихся от других гликопротеидов сыворотки. Несмотря на небольшое содержание в сыворотке, они оказывают большое влияние на ее вязкое содержание в сыворотке, они оказывают большое влияние на ее вязкость и наряду со специфическим белком сыворотки, влияющим на агрегацию эритроцитов, в значительной степени определяют скорость оседания эритроцитов. Функция этих белков еще далеко не выяснена, но тот факт, что их количество значительно меняется при различных воспалительных поражениях кожи, заставляет обратить особое внимание на роль их в патогенезе различных воспалительных реакций.

Что касается роли изменений в содержании α - и β -глобулинов в сыворотке в патогенезе различных заболеваний, то она мало изучена. Отчасти это обусловлено тем, что мы до сих пор еще очень мало знаем о факторах, вызывающих изменения в содержании этих белков. В ряде работ, проведенных в нашей лаборатории, было показано, что одной из причин, вызывающих увеличение α_1 - и α_2 -глобулинов, может быть усиленный переход их из ткани

печени в кровь [24, 25]. Поскольку электрофоретическая подвижность ряда белков печени точно соответствует электрофоретической подвижности α_1 - и α_2 -глобулинов сыворотки, такой переход при некоторых патологических состояниях вызовет заметное увеличение количества идентичных по подвижности белков сыворотки, хотя по многим другим своим свойствам переходящие из печени белки могут резко отличаться от истинных сывороточных белков.

Такой переход с несомненностью установлен для ряда ферментных белков тканей (аминофераз печени и сердечной мышцы при развитии в этих тканях воспалительных и некротических процессов, лактикодегидрогеназы печени, фосфатаз предстательной и грудной железы, амилазы поджелудочной железы и т. д.), для ферритина печени, для ряда аномальных глобулинов, отличающихся способностью осаждаться в сыворотке при ее охлаждении (криоглобулины сыворотки при множественной миеломе, тромбоцитопении, пурпуре), для некоторых аномальных макроглобулинов (анемия Вальденштрема) и ряда других. Переход этих белков не только увеличивает содержания α - и β -глобулинов в сыворотке, но в ряде случаев меняет и ее физико-химические свойства, а также обуславливает изменения иммунологических свойств ее белков.

В нашей лаборатории установлено, что как при экспериментальных поражениях печени и почек, так и у больных с гепатитами, циррозами печени, флегмонозными холециститами, нефрозами, а также другими поражениями печени и почек в сыворотке появляются в значительных количествах белки с отличными от нормальных белков сыворотки иммунохимическими свойствами [26, 27].

В настоящее время нельзя еще сказать, с чем связано появление этих белков. Возможно, что при указанных заболеваниях в печени несколько изменяется процесс образования альбуминов α - и β -глобулинов, в результате чего в сыворотке крови появляются белки, близкие по электрофоретической подвижности к нормальным, но с несколько измененной структурой, и они уже не реагируют с антителами к нормальным сывороточным белкам. Можно также допустить, что при указанных заболеваниях происходят изменения в характере комплексов, образуемых сывороточными белками с различными соединениями, например с липидами, и в связи с этим видоизменяются их антигенные свойства. Каков бы, однако, ни был истинный механизм изменения иммунохимических свойств белков сыворотки, возникающие нарушения несомненно могут оказывать серьезное влияние на течение заболевания. В частности, необходимо обратить внимание на возможность образования в организме указанных больных особых аутоантител к этим измененным белкам и образование в связи с этим новых белковых комплексов.

В данной статье мы привели ряд примеров, показывающих роль сывороточных белков в транспорте различных соединений и значение соответствующих нарушений в генезе некоторых заболеваний. Число этих примеров можно было бы значительно умножить, но уже сказанного, как нам кажется, достаточно, чтобы стало ясно, какое значение могут иметь дальнейшие совместные усилия биохимиков и клиницистов в данном направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Плотникова Н. Е. Успехи биологической химии, 1958, III, 78.
2. Андреев Г. В. Успехи современной биологии, 1960, 49, в. 3, 338.
3. Lewis G. P.; *Physiol. Rev.*, 1960, 40, No 4, 647.
4. Laurell C. B. a. S co o g N. Scand J. Clin and Labor. Invest., 1956, 8, 21.
5. C o h n E. J. Amer. Chem. Soc., 1947, 69, 1753.

6. Goodman D. S. J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 3892.
 7. Капланский С. Я. Тезисы докладов на IX съезде физиологов, биохимиков и фармакологов. Москва — Минск, 1959, 3, стр. 160.
 8. Charlwood P., Gordon A. Biochem J., 1958, 69, 627, 70, 433.
 9. Троицкий Г. В., Окулов В. И., Соркина Д. А. Биохимия, 1961, 26, в. 1, 44.
 10. Robbing J. a. Rall J. Physiol. Rev., 1960, 40, No. 3, 415.
 11. Daughaday W. Physiol. Rev., 1959, 39, No 4, 885.
 12. Florini I. a. Buyske D. J. Biol. Chem., 1961, 236, No. 1, 247.
 13. Slanwhite W. a. Sandberg A. J. Clin. Invest, 1959, 38, 384.
 14. Капланский С. Я., Гурвич А. Е., Старосельцева Л. К. Биохимия, 1958, 23, в. 1, 114.
 15. Гинодман Л. М. Вопросы вирусологии, 1957, № 4, 195.
 16. Gitlin D., Londing R., Whipple A. J. exper. Med., 1953, 97, 163.
 17. Klinberger H. u. Schollmeyer. Biochem Z., 1960, 173, No. 4, 335.
 18. Karusch F. J. Amer. Chem. Soc., 1950, 72, 2705, 1951, 73, 1955.
 19. Foster J. Plasma Protein, Acad. Press., New York, 1960, 1.
 20. Троицкий Г. В.; Окулов В. И. Тезисы 9-го Всесоюзного съезда физиологов, биохимиков и фармакологов, 1959, 2, 224.
 21. Капланский С. Я., Старосельцева Л. К. Биохимия, 1959, 24, в. 1, 87.
 22. Iorke D. u. Hendel H. Klin. Wschr., 1956, 34, 907.
 23. Gitlin D. Ann New York Acad. Sci., 1957, 70, 123.
 24. Капланский С. Я. В кн.: Актуальные вопросы современной биохимии. М., 1959, 1, стр. 132.
 25. Лебедева Н. К. Вопросы медицинской химии, 1958, 4, в. 5, 373.
 26. Капланский С. Я., Лебедева Н. К., Старосельцева Л. К. Вопросы медицинской химии, 1959, 5, в. 3, 225.
 27. Бондарь З. А., Капланский С. Я., Макарова Н. А., Старосельцева Л. К., Шмультян Т. Р. Терапевтический архив, 1960, в. 11, 21.
-

ГЛАВА XI

ФЕРМЕНТЫ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

1. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ КРОВИ

А. А. Покровский

Развитие клинической химии представляет возрастающее число примеров, которые могут служить подтверждением гипотезы о том, что в основе любого патологического процесса должны лежать нарушения координированной деятельности ферментных систем. Следовательно, направленное изучение ферментной активности крови и других тканей больного организма должно явиться наиболее специфичным и тонким приемом патохимического анализа в диагностических целях.

Четким примером определяющей роли избирательного нарушения отдельных ферментных систем в механизме развития заболеваний и возможности их использования в диагностических целях являются интегральные патологические процессы, возникающие при воздействии некоторых ядов (см. главу XI статью 2).

Интенсивные биохимические исследования последних лет позволяют находить избирательные изменения ферментной активности и при ряде других, значительно более сложных по этиологии заболеваний. В литературе накоплены многие сотни сообщений, посвященных клиническим методам определения ферментной активности и оценке их диагностического значения. В результате в настоящее время можно говорить об определенных биохимических синдромах, характеризующих отдельные заболевания, и о надежных лабораторных методах, помогающих врачу принимать правильное решение в трудных случаях [1—5].

Замечательная особенность ферментов, усиливающая целесообразность их исследования в диагностических целях, состоит в возможности дифференцированного определения активности каждого биокатализатора в сложных белковых смесях без предварительного фракционирования.

По понятным причинам особое внимание клиницистов привлекает исследование крови, ферментный состав которой относительно сложен, но постоянен в здоровом организме, имеет многообразные источники происхождения и в силу этого является достаточно чувствительным и тонким индикатором возникновения отдельных патологических состояний организма.

В настоящее время в плазме крови обнаружено свыше пятидесяти ферментов, для каждого из которых должны существовать физиологические и «патологические» границы колебаний.

Удается обнаружить три типа изменения ферментного спектра крови: 1) понижение активности постоянно присутствующих в крови ферментов,

или гипоферментемии, что связано обычно с гипофункцией пораженных органов; 2) повышение содержания этих же ферментов, или гиперферментемии, обусловлено либо повышением функции органа, либо нарушением экскреции по физиологическим путям, либо патологической проницаемостью гистогематических барьеров; 3) появление в крови ферментов, которые в здоровом организме в нее не поступают, что объясняется нарушением проницаемости гистогематических барьеров либо адаптивным синтезом защитных ферментов. Перечисленные изменения в ряде случаев являются настолько специфичными, что их обнаружение может служить решающим подтверждением клинического диагноза, а изучение их в динамике — ценным показателем эффективности применяемых методов лечения и прогностическим тестом. Особое значение эти методы приобретают при диагностике заболеваний печени, сердца, панкреатической железы, обнаружении некоторых видов злокачественных новообразований, распознавании интоксикаций и т. п. Важными особенностями ферментных методов являются их относительная специфичность и возможность использования в ранних стадиях заболеваний.

В настоящем обзоре сообщаются самые краткие сведения о диагностическом значении изменения активности некоторых ферментных систем крови, получивших наибольшую апробацию и признание в клинической практике.

Фосфомоноэстеразы. При оценке данных об изменении активности фосфатаз сыворотки крови следует иметь в виду различные источники происхождения данных ферментов, а также различия биокаталитических свойств отдельных белковых фракций. Фосфатазы могут поступать в кровь из печени, костного мозга, селезенки, почек, а при заболеваниях — из предстательной железы и ряда других органов.

Группа щелочных фосфатаз, или фосфомоноэстераза I, с помощью электрофореза на крахмале была разделена на три фракции, передвигающиеся соответственно с α_1 -, α_2 - и β -глобулинами [6-9]. В группе кислых фосфатаз различают фосфомоноэстеразу II (оптимальный pH 4,6), содержащуюся в очень больших количествах в простатической железе, фосфомоноэстеразу III (оптимальный pH 3,4—4,2), обнаруживаемую в печени и ряде других паренхиматозных органов, и фосфомоноэстеразу IV (оптимальный pH 5,2—6,2), находящуюся в эритроцитах. Все эти эстеразы при определенных условиях могут поступать в сыворотку крови в больших или меньших количествах и служить показателем степени вовлечения в патологический процесс тех или иных органов.

В клинической практике обычно ограничиваются определением интегральных показателей активности щелочных и кислых фосфатаз, уделяя особое внимание симптому гиперфосфатаземий. Эти показатели успешно применяются в целях дифференциальной диагностики заболеваний печени, костей и простатической железы. При заболеваниях печени наиболее высокие цифры, превышающие нормальные величины в 5—10 раз, отмечены при механических желтухах, связанных с поступлением фермента в кровь [10—14]. По данным Гутмана и сотрудников, примерно в одной трети случаев при механических желтухах содержание фосфомоноэстеразы достигает 25—30 единиц Боданского вместо 2,5—3,0 единиц в норме. При других заболеваниях печени — острых гепатитах, холангитах, циррозах и т. д. — цифры активности колеблются обычно либо около верхних границ нормы, либо оказываются умеренно повышенными. Исключение составляет острая желтая атрофия печени, при которой содержание фосфомоноэстеразы достигают огромных величин.

Большинство авторов склонно также придавать важное значение определению активности фосфомоноэстеразы I при проведении дифференциальной диагностики метастатического рака печени. Умеренная гиперфосфата-

земля, несомненно, является относительно ранним спутником метастазов злокачественных новообразований. По статистике Мендельсона и Боданского [15, 16], при метастатическом раке активность фосфатазы в дожелтушных периодах бывает повышена в 87% случаев. Для дифференциальной диагностики имеет значение и тот факт, что при заболеваниях печени преимущественно увеличивается активность фосфомоноэстеразы, передвигающейся с фракцией α -глобулинов, а при заболеваниях костей — содержание того же фермента, связанного с β -глобулинами [6, 7]. Разумеется, для диагностики могут оказаться полезными данные определения активности других ферментов крови: фосфогексоизомеразы, альдолазы, холинэстеразы и трансаминазы, меняющихся при заболеваниях печени в значительно большей степени, чем при заболеваниях костей (см. последующие разделы).



Рис. 1. Возможные изменения активности фосфомоноэстераз крови при некоторых заболеваниях.

обычно соответствует тяжести заболевания и в очень тяжелых случаях может достигнуть чрезвычайно высоких цифр (200 единиц Боданского) [6, 17]. Важным обстоятельством является возможность выявления гиперфосфатаземии в латентной скрытой стадии заболевания, что позволяет использовать фосфатазный тест в качестве вспомогательного приема в целях выявления предраковых состояний.

Значительное повышение активности фосфомоноэстеразы I обнаруживается обычно при остеомалации, но не бывает при старческом остеопорозе, что может быть использовано в качестве диагностического признака [3, 18]. Значительная гиперфосфатаземия наблюдается при болезни Педжета (до 130 единиц Боданского) и при первичном гиперпаратиреозидизме. Однако если в первом случае содержание кальция и фосфатов в сыворотке крови находится в пределах нормы, то во втором оказывается резко повышенным.

Резкая гиперфосфатаземия имеет место при злокачественных костных новообразованиях остеобластического типа [19, 20, 6], но она отсутствует при доброкачественных опухолях и новообразованиях остеолитического типа. При остеобластических саркомах содержание фосфомоноэстеразы I в сыворотке крови может повыситься по сравнению с нормальными величинами в 20—40 раз. Естественно, что симптом гиперфосфатаземии может быть использован для выявления метастатического рака в костях только в случае исключения метастазов в области печени. Некоторое представление о характере изменений фосфомоноэстераз дает рис. 1. Отдельные ступени «лестницы» характеризуют максимальные уровни активности ферментов, соответствующие данной группе заболеваний.

Определение активности фосфомоноэстеразы II (кислая фосфатаза) в сыворотке крови имеет исключительное значение при диагностике заболеваний предстательной железы и, в частности, рака [21—24]. Содержание

данного фермента в сыворотке крови здоровых людей не превышает 0,5 единицы Боданского. Резкое повышение содержания фосфомоноэстеразы 2 может возникнуть при раке предстательной железы. Гиперфосфатаземия 2 подтверждает наличие рака с большой достоверностью. Однако содержание данного фермента на уровне нормальных величин не может считаться доказательством отсутствия опухоли, так как повышение содержания фермента встречается лишь в $1/4$ случаев первичного рака предстательной железы, не сопровождающихся метастазами. Резкая гиперфосфатаземия обычно свидетельствует о преодолении опухолевыми клетками барьера железы и ее метастазировании. Число положительных ответов при проведении фосфатного теста при диагностике раков предстательной железы можно повысить путем применения так называемых провокационных проб, основанных на стимулировании функции железы тестостероном [23, 25]. Важно отметить, что изучение динамики изменения фосфатазного зеркала крови при раке предстательной железы может служить достаточно надежным показателем эффективности терапевтического применения эстрогенов.

При определении активности фосфомоноэстеразы сыворотки крови следует иметь в виду высокое содержание другой кислой фосфатазы — фосфомоноэстеразы 4 — в эритроцитах, вследствие чего работа даже со слегка гемолизированной кровью связана со значительными ошибками. Таким образом, определение различных фосфатаз в сыворотке крови может служить ценным вспомогательным приемом не только при диагностике достаточно широкого круга заболеваний, но и в ряде случаев для наблюдения за динамикой течения патологического процесса и оценки эффективности терапевтических мероприятий.

Трансаминазы. За последние годы исследованию диагностического значения уровня трансаминаз, ферментов, открытых советскими учеными А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман [27], уделяется особое внимание. Центральная роль переноса аминок групп в процессах белкового обмена делает понятным широкое распространение данных ферментов в тканях животного организма [28, 29]. В кровь могут поступать трансаминазы различного происхождения и специфичности. Наибольшее значение имеют две трансаминазы: глутамат-аспартат — и глутамат-аланин-трансаминаза, катализирующие обратимый перенос аминок групп между α -кетоглutarовой кислотой и соответственно аланином и аспарагиновой кислотой. В тканях ряда органов содержатся значительные количества трансаминаз, в сотни и тысячи раз превышающие уровень активности данных ферментов в сыворотке крови. При электрофорезе они мигрируют с α_2 - и γ -глобулинами [30, 31]. Особенно высоким содержанием глутамат-аспартат-трансаминазы отличаются: сердце — около 150 000 единиц, печень — 140 000, мышцы — 100 000, почки — 90 000, поджелудочная железа — 3000 единиц и т. п. В то же время в сыворотке крови содержится всего от 5 до 40 (в среднем 20) единиц. Глутамат-аланин-трансаминаза в наибольших количествах обнаруживается в печени — около 44 000 единиц (в силу чего ее иногда называют печеночной трансаминазой), поджелудочной железе — 20 000, сердце — 7000 и скелетных мышцах — 5000 единиц. В сыворотке крови содержание данного фермента в среднем соответствует 15 единицам (от 4 до 35).

Столь значительные различия в активности трансаминаз в сыворотке крови и тканях органов делают понятной возможность резкого скачка уровня данных ферментов в крови в случае некроза и последующего всасывания продуктов распада даже небольших участков тканей органов, богатых трансаминазами [32—46].

Постоянное внимание клиницистов привлек установленный Ла Дью, Вроблевским и сотрудниками факт весьма значительного повышения активности глутамат-аспартат-трансаминазы сыворотки крови при инфарктах

миокарда. Степень наступающей при этом гиперферментемии была тем выше, чем массивнее инфаркт [32—45]. Обычно уровень трансаминаз при инфарктах миокарда не превышает 400—500 единиц, однако в отдельных случаях гипертрансаминаземия может достигать очень высоких степеней — 1000—1300 единиц [32, 39, 40]. Исследование трансаминазной активности сыворотки в динамике обычно позволяет выявить характерную кривую: начало подъема через 2—5 часов после возникновения заболевания, достижение максимума к концу первых суток и последующее постепенное снижение до нормальных цифр в течение 3—6 дней. Степень гипертрансаминаземии, равно как и характер кривой, имеет не только диагностическое, но и прогностическое значение [37—39, 47, 48]. При очень тяжелых инфарктах гипертрансаминаземии могут затягиваться на несколько недель. В литературе приводятся различные цифры совпадения результатов трансаминазной пробы с клиническим диагнозом инфаркта. Большинство авторов называет цифры от 90 до 100%. По-видимому, степень достоверности пробы существенно повышается при многократном повторении исследований с самого начала заболевания.

Важно подчеркнуть, что повышение активности трансаминаз при различного вида коронарной недостаточности, за исключением инфаркта (грудной жабе, пороках сердца и ряде других заболеваний), как правило, не регистрируется или носит умеренный характер [38, 39, 43]. Таким образом, определение активности глютамат-аспартат-трансаминазы следует отнести к достаточно чувствительным дифференциально-диагностическим лабораторным тестам.

Следует иметь в виду также, что повышение трансаминазной активности может иметь место при заболеваниях других органов, которые обладают высоким содержанием данных ферментов, особенно печени, поджелудочной железы и мышц. Высокими степенями гипертрансаминаземии сопровождаются острые повреждения паренхимы печени, связанные с воспалительными и некротическими процессами [49—55]. Так, при повреждении печени в результате токсического воздействия четыреххлористого углерода трансаминазная активность сыворотки крови достигает огромных величин — 27 840 (Вроблевский). Достаточно высокие величины (1000—2000 единиц) характеризуют трансаминазную активность сыворотки крови и при гепатитах вирусного происхождения — болезни Боткина [56—60]. Кривая ферментной активности при данном заболевании обнаруживает максимум на 6—10-й день и постепенно возвращается к нормальным величинам к 15—20-му дню. Ценным диагностическим признаком служит весьма раннее появление гипертрансаминаземии в дожелтушную инкубационную стадию болезни Боткина [57, 61]. Характерным для заболевания печени является более значительное повышение уровня глютамат-аланин-трансаминазы [62—64]. В результате значительно уменьшается величина коэффициента, отражающего взаимоотношение активностей глютамат-аспартат- и глютамат-аланин-трансаминазы. У здоровых людей средняя величина данного коэффициента составляет:

$$K = \frac{Гл\ As}{Гл\ Ал} = 1,33 \pm 0,42$$

(Де Ритис и сотрудники); у больных острым вирусным гепатитом — 0,65, при инфарктах миокарда величина этого коэффициента резко возрастает. Так же как и при других гиперферментемиях, при вирусных гепатитах между тяжестью и распространенностью патологического процесса, с одной стороны, и выраженностью гипертрансаминаземии, с другой, существует определенное соответствие [54, 65]. Таким образом, трансаминазный тест, осо-

бенно при условии дифференцированного определения глутамат-аспартат- и глутамат-аланин-трансаминаз, является ценным вспомогательным диагностическим приемом для выявления острых гепатитов. Важно иметь в виду, что механические желтухи (холангиты и ряд других заболеваний печени) обычно не сопровождаются повышением трансаминазной активности, в то время как метастазы рака в печени характеризуются гипертрансаминазепространенности опухоли.

Увеличение трансаминазной активности (ГлАсп и ГлАл) сыворотки крови отмечается также и при острых панкреатитах [37, 63, 67], однако диагностическая ценность определения данного фермента при панкреатитах в силу большой распространенности трансаминаз значительно ниже, чем изучения активности амилазы.

Наконец, высокое содержание трансаминаз в мышцах объясняет появление гиперферментемии при обширных травмах, гангрене, а также случаях прогрессивной мышечной дистрофии [44, 68, 69]. Подобные гипертрансаминаземии не имеют, разумеется, самостоятельного диагностического значения, но должны учитываться при трактовке результатов трансаминазного теста. Кроме того, в литературе имеются многочисленные сообщения о возможности значительного повышения трансаминазной активности сыворотки крови при кровоизлияниях в мозг и инфарктах легкого [70—75]. Правда, повышение содержания трансаминаз при данных заболеваниях встречается далеко не во всех случаях.

Многие авторы склонны рассматривать определение глутамат-аспартат-трансаминазы как ценный тест при проведении дифференциальной диагностики между инфарктами сердца и легких [70—73]. Основанием к этому служит значительно более высокое (примерно в 50 раз) содержание фермента в мышце сердца по сравнению с тканью легкого.

Действительно, Израэль, Гольдштейн и сотрудники обнаружили гипертрансаминаземии при инфарктах легкого только в небольшом проценте случаев [70, 71]. Однако, по данным других авторов, этот процент оказывается значительно более высоким [70, 74], таким образом, диагностическая ценность определения трансаминаз в целях дифференцирования инфарктов легкого и сердца ограничена. Представление о характере и величине нарушений трансаминазной активности при различных заболеваниях можно составить на основании рис. 2.

Оценивая диагностическое значение определения трансаминаз, следует подчеркнуть несомненную полезность его применения при заболеваниях сердца и печени и в то же время отметить некоторую монотонность возникновения гипертрансаминаземий при многих заболеваниях, заставляющих рассматривать указанный метод как интегральный тест на некротические изменения в ряде паренхиматозных органов и мышцах.

Альдолаза, так же как и трансаминазы, — широко распространенный фермент, содержание которого в паренхиматозных органах, мышцах и эритроцитах намного выше, чем в сыворотке крови. Общность распределения

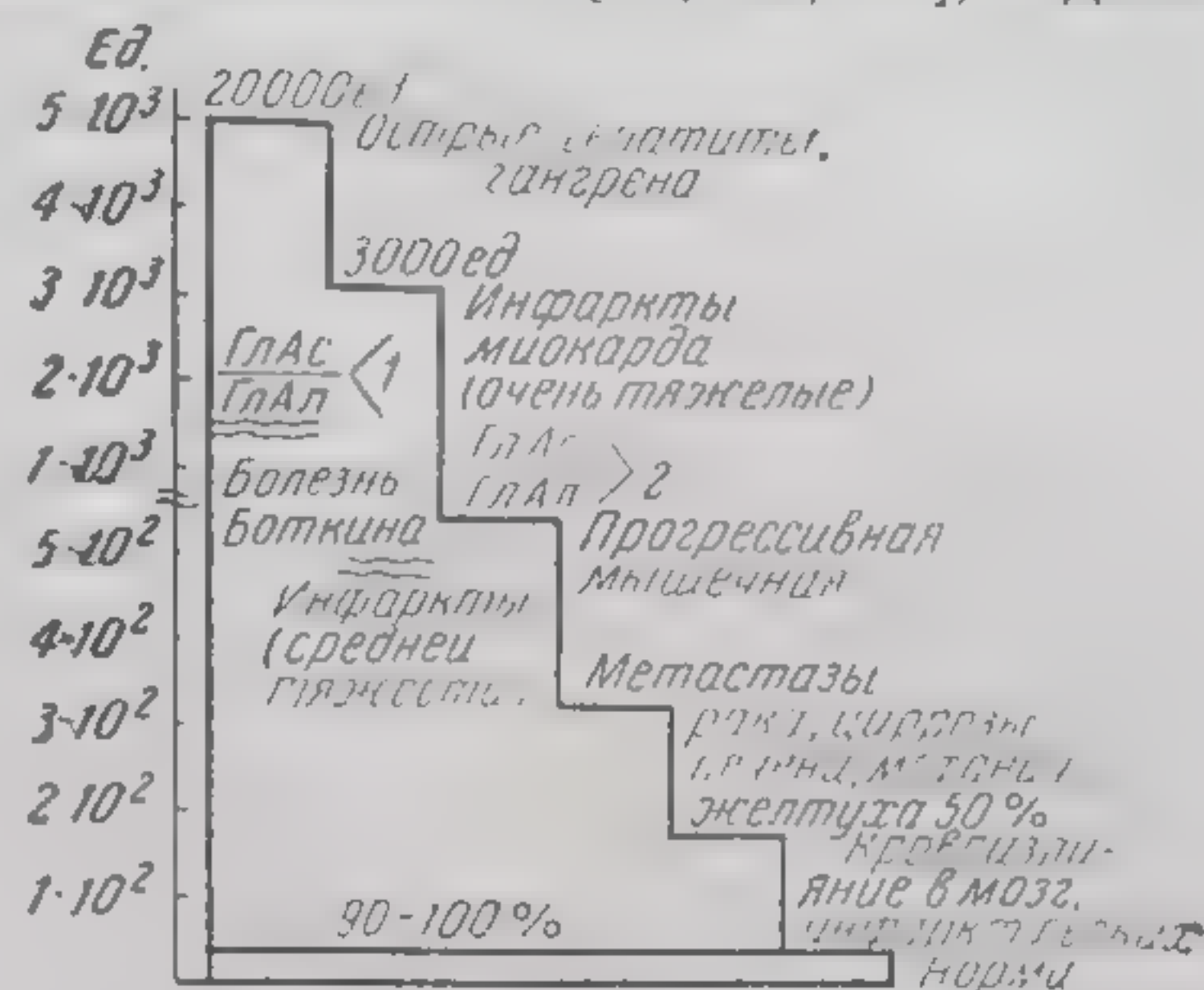


Рис. 2. Возможные изменения активности аминотрансфераз крови при некоторых заболеваниях.

наз, является ценным вспомогательным диа-
явления острых гепатитов. Важно иметь в виду,
холангиты и ряд других заболеваний печени)
повышением трансаминазной активности, в то
в печени характеризуются гипертрансаминазе-
едних в определенной мере соответствует рас-

вной активности (ГлАсп и ГлАл) сыворотки
при острых панкреатитах [37, 63, 67], однако
преде-

и пан-
й рас-
из зна-
ия ак-

ожание
ясняет
и при
ене, а
ой мы-
9]. По-
мии не
оатель-

ачения,
трак-
назного
ературе

ообщения о возможности значительного повы-
ивности сыворотки крови при кровоизлияниях
кого [70—75]. Правда, повышение содержания
заболеваниях встречается далеко не во всех

ы рассматривать определение глютамат-аспартат-
тест при проведении дифференциальной диагнос-

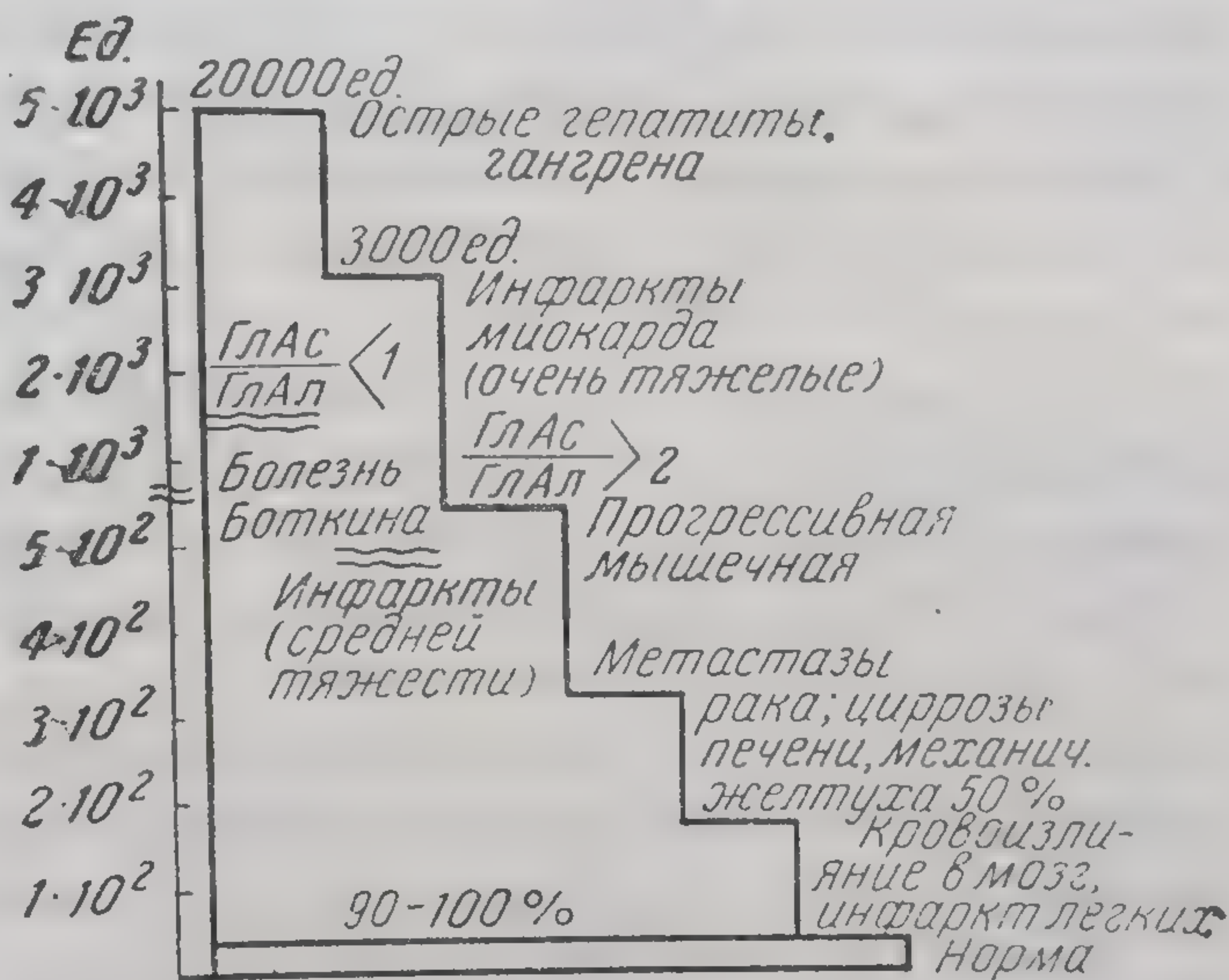


Рис. 2. Возможные изменения активности аминотераз крови при некоторых заболеваниях.

данных ферментов в тканях организма лежит в основе близкого характера изменений их активности в крови при различных заболеваниях. Выраженные гиперальдолаземии возникают при острых гепатитах, инфарктах миокарда и легкого, дистрофиях мышц и некоторых видах опухолей, особенно после метастазирования [76—95].

Наиболее постоянное и выраженное повышение альдолазной активности сыворотки крови наблюдается при острых инфекционных и токсических гепатитах. При болезни Боткина содержание альдолазы в сыворотке может повыситься до 100 единиц вместо 3—8 в норме [76—83]. Максимальная гиперферментемия имеет место в течение первой недели, после чего наблюдается постепенное понижение активности до нормальных цифр, соответствующее общему течению реконвалесценции. Резкая гиперальдолаземия отмечена в результате отравлений четыреххлористым углеродом, хлорпромазином и другими токсическими веществами, нарушающими функции печени [76, 79]. Степень повышения активности фермента находится в прямой зависимости от тяжести процесса и его распространенности. Большинство авторов рассматривает этот вид гиперальдолаземий как следствие выхода фермента из поврежденных клеток печени. В отличие от них В. Товарницкий и Е. Валуйская [84, 85] рассматривают гиперальдолаземии при вирусных гепатитах как следствие активирующего влияния вируса на фермент сыворотки крови. Некоторые авторы полагают возможным главную роль отвести освобождению фермента из эритроцитов вследствие значительного понижения их осмотической стойкости [86].

При большинстве других заболеваний печени — циррозах, хронических гепатитах, механической желтухе, холангитах и т. п. — уровень альдолазы сыворотки крови повышается незначительно и не во всех случаях. Таким образом, альдолазный тест несомненно имеет важное диагностическое значение при заболеваниях печени.

Гиперальдолаземия является обязательным симптомом и при инфарктах миокарда [87—89], причем характер изменения активности данного фермента и трансаминаферазы во времени является достаточно близким. Большинство авторов подчеркивает целесообразность возможно более раннего обследования больных инфарктом на содержание альдолазы в сыворотке крови [87—90]. Наиболее высокий уровень гиперальдолаземии наблюдается к концу первых суток после возникновения заболеваний. Затягивание гиперальдолаземии и особенно последующие подъемы ферментной активности могут рассматриваться как следствие повторных инфарктов [89, 90].

В соответствии с гипотезой о возможности выхода альдолазы из некротизированной ткани находятся данные Шапиро и сотрудников [91] о возникновении гиперальдолаземии при прогрессирующей дистрофии мышц. При данном заболевании уровень альдолазной активности может превысить нормальные величины в 5—10 раз [91, 92].

Наконец, следует упомянуть о возможности значительного повышения альдолазной активности сыворотки крови при метастазирующем раке печени.

Амилаза. Определение активности α -амилазы в сыворотке крови широко используется в клинической практике с целью диагностики заболеваний поджелудочной железы. Содержание амилазы в тканях панкреас намного выше, чем в крови и тканях паренхиматозных органов, что объясняет значительную специфичность гиперамилаземий, возникающих при острых панкреатитах. Показанное еще Вольгемутом [96, 64] значительное увеличение амилазной активности крови и мочи при острых панкреатитах получило многократное подтверждение [97—104]. Патогномоничность данного симптома делает его ценным диагностическим признаком при дифференцировке острых панкреатитов от острых приступов желчнокаменной бо-

лезни, перфорирующих язв желудка и кишок, а также острой непроходимости кишечника [105—106].

Для острого панкреатита характерно резкое повышение амилазной активности, проявляющееся превышением нормальных цифр в 10—30 раз и лаземия является ранним и относительно быстро проходящим симптомом острых панкреатитов, что не всегда учитывается при анализе данных лабораторных исследований. Обычно резкое повышение амилазной активности можно обнаружить только в первые и реже во вторые сутки заболевания, т. е. в тот период времени, когда больной далеко не всегда попадает в клинику для квалифицированного лабораторного обследования. В более поздние сроки даже при наличии тяжелого панкреатита амилазная активность крови приближается к норме. Данное обстоятельство может служить причиной диагностических ошибок, снижающих действительную диагностическую ценность амилазного теста.

Электрофоретические исследования позволяют выявить некоторые различия в распределении амилазы в крови здоровых и больных панкреатитом людей на электрофореграммах. У здоровых людей наибольшая амилазная активность обнаруживается в зоне альбуминовой фракции, а при панкреатитах — в зоне γ -глобулинов [101].

При оценке определения амилазной активности следует иметь в виду также, что значительная гиперاميлаземия может иметь место в отдельных случаях и при других заболеваниях, связанных с синдромом «острого живота», например, при прободении язвы двенадцатиперстной кишки, острой непроходимости кишечника. В этих случаях повышение амилазного индекса крови связано, по-видимому, со всасыванием содержимого тонкого кишечника в кровь [99, 109]. Однако ни в одном из случаев гиперاميлаземия не достигает столь значительных цифр, как при острых панкреатитах. При острых панкреатитах гиперاميлаземия превышает нормальные цифры в 10—30 раз, а при других острых заболеваниях органов брюшной полости — в 3—5 раз.

Большинство авторов относит определение амилазной активности крови к весьма полезным диагностическим тестам, помогающим врачу принимать правильное решение по поводу необходимости хирургического вмешательства или терапевтического лечения при острых заболеваниях органов брюшной полости. При использовании его следует иметь в виду, разумеется, возможность значительного повышения содержания амилазы крови также в случае воспаления слюнных желез [106, 107, 110]. Однако ясно очерченная клиника этих заболеваний обычно не нуждается в лабораторном подтверждении.

Резкая гиперاميлаземия при острых панкреатитах обычно сопровождается значительным увеличением выделения амилазы с мочой, в силу чего исследование последней может быть рекомендовано в качестве вспомогательного диагностического приема. Результаты исследования мочи все же обычно бывают менее четкими, чем крови, что объясняется влиянием на данный показатель концентрирующей способности почек [104].

Одновременное определение амилазной активности в крови и моче оказалось полезным для суждения о состоянии функции почечного фильтра. Отмечено, что различные заболевания почек, нефрозы, гломерулонефриты, нефроциррозы и т. п., как правило, сопровождаются увеличением амилазной активности [107, 112—114]. В то же время содержание амилазы в моче резко снижается. Таким образом, коэффициент:

$$K = \frac{\text{активность амилазы крови}}{\text{активность амилазы мочи}}$$

может служить показателем функциональной полноценности почечного фильтра. Резкое возрастание этого коэффициента заставляет подозревать наличие заболевания почек.

В литературе имеются многочисленные попытки применения амилазного теста для диагностики других заболеваний. В частности, приводятся данные о некотором повышении содержания амилазы крови при хронических панкреатитах [3, 103]. Умеренный характер такого повышения в значительной степени снижает диагностическую ценность этого теста. Приходится признать, что только систематическое исследование амилазной активности, особенно в период обострения болезни, может способствовать восстановлению правильного диагноза хронического панкреатита.



Рис. 3. Возможные изменения активности амилазы крови при некоторых заболеваниях.

Ряд исследований посвящен изучению возможности привлечения определения амилазной активности крови для целей диагностики злокачественных новообразований. Вейссом и Люром опубликованы данные о наличии постоянной гиперاميлаземии при злокачественных новообразованиях в легких [3]. Однако последующая проверка позволила считать результаты этих исследований ошибочными. Ни при одном из видов новообразований, за исключением опухолей головки поджелудочной железы и слюнных желез, не удалось отметить постоянной гиперاميлаземии.

Определенный интерес вызывает твердо установленный факт понижения амилазной активности крови при различных заболеваниях, связанных с нарушениями функции печени [102, 116, 117]. Механизм этого явления не может считаться выясненным, так как печень, несомненно, не принимает непосредственного участия в синтезе амилазы крови. Однако при достаточно разнообразных страданиях данного органа от острых гепатитов до циррозов и разнообразных интоксикаций, затрагивающих паренхиму печени, наблюдается падение амилазной активности до 50—30 единиц Самоги вместо 80—150 в норме.

Таким образом, изменение амилазной активности в патологии представляет достаточно сложную картину. Характер возможных изменений амилазной активности крови при некоторых заболеваниях отражен на рис. 3.

Очевидно, что повышения эффективности исследования амилазной активности при острых панкреатитах можно ожидать только в результате разработки достаточно простых и точных методов определения данного фермента, использование которых было бы доступным для рядового врача и сестры непосредственно у постели больного.

Холинэстеразы. Характер изменений холинэстеразной активности при различных заболеваниях в существенной степени отличается от ранее рассмотренных ферментов. Если для трансаминафераз, альдолазы, амилазы и

фосфатаз главный диагностический интерес имели гиперферментемии, то для холинэстераз (ХЭ) наиболее важным является понижение ферментной активности крови.

В крови человека содержится два вида холинэстераз: специфическая, истинная или ацетилхолинэстераза, локализуемая в эритроцитах, и неспецифическая, ложная или бутирилхолинэстераза, находящаяся в сыворотке крови. При электрофоретическом разделении фермент обнаруживается в районе локализации α_2 -глобулиновой фракции [118–120]. Уровень холинэстеразной активности в крови различных клинически здоровых людей может колебаться в достаточно значительных пределах (от 4,0 до 9,1 М на 1 мл крови в минуту для бутирилхолина и от 4,4 до 10,0 μ М для ацетилхолина). Однако уровень активности холинэстераз в крови одного и того же человека обнаруживает значительное постоянство. Существенные отклонения от этого уровня связаны обычно с возникновением заболеваний [121, 140, 143]. Клиническое значение понижения уровня неспецифической холинэстеразы сыворотки крови послужило предметом многочисленных исследований. Предложено более 100 вариантов методов определения ее активности. Наиболее изученными являются глубокие гипохолинэстераземии, сопровождающие заболевания паренхимы печени [121–131, 133–141]. Этот факт, отмеченный впервые Антополем и сотрудниками [122], в дальнейшем получил многочисленные подтверждения. Степень снижения уровня фермента в сыворотке отражает тяжесть и распространенность поражения печеночных клеток. Она, как правило, выше при длительно текущих хронических процессах, в частности хронических гепатитах и особенно циррозах печени [137, 138]. Весьма низкий уровень холинэстеразной активности отмечается при распространенных злокачественных новообразованиях печени. Однако и острые гепатиты, в частности болезнь Боткина, обычно сопровождаются понижением холинэстеразной активности.

У больных механической желтухой, которая не сопровождается значительными нарушениями со стороны паренхимы печени, уровень активности холинэстераз остается без существенных изменений.

Механизм возникновения гипохолинэстераземий при заболеваниях печени представляется относительно ясным. Есть все основания полагать, что синтез неспецифической холинэстеразной сыворотки крови, так же как и альбуминов, происходит в печеночных клетках. Уменьшение холинэстеразной активности является, таким образом, отражением угнетения протеосинтетической функции печени. Специфическая ферментная активность холинэстераз делает ее удобным объектом для количественной оценки этой функции печени. Закономерным является ее понижение и при ряде заболеваний, связанных с резким нарушением белкового обмена: гипопроteinемиями, кахектическими состояниями и т. п.

Несомненный интерес вызывают данные о возникновении глубоких гипохолинэстераземий при инфарктах миокарда [2, 132, 135]. Причины подобных гипохолинэстераземий представляются не вполне ясными, так как возможность синтеза холинэстераз в мышце сердца исключена. К тому же особенно трудным для объяснения с позиций гипотезы о нарушении синтеза фермента является факт значительной остроты развития гипохолинэстераземии. Действительно, при инфарктах резкое падение холинэстеразной активности отмечается уже к концу первых суток после начала заболевания. В связи с этим вполне вероятно предположение об образовании в некротизированном участке миокарда продуктов тканевого распада, обладающих выраженным антихолинэстеразным действием.

О возможности исключительно сильного и остро возникающего, в некоторых случаях тотального подавления холинэстеразной активности крови следует помнить при отравлении некоторыми токсическими веществами, в

частности получающими все большее распространение в сельском хозяйстве фосфорсодержащими инсектицидами, а также фосфорсодержащими боевыми отравляющими веществами, токсическому действию которых значительное внимание уделяет зарубежная пресса [142—154, 164]. Расшифровка механизма токсического действия этих веществ является одним из наиболее четких примеров продуктивности применения методов биохимических исследований в патологии. Представлены исчерпывающие доказательства взаимодействия фосфорсодержащих веществ с гидроксильными группами серина холинэстераз с образованием фосфорил серина, причем в этой реакции принимает участие всего лишь $\frac{1}{20}$ остатков серина, содержащихся в составе молекулы фермента [149—154]. Многие косвенные доказательства заставляют предполагать, что фосфорилированию серина предшествует стадия обратимого взаимодействия фосфорсодержащих веществ с имидазольным кольцом гистидина. Применение нуклесфильных агентов, подсобных гидроксиламину и его производным, позволяет дефосфорилировать и, следовательно, реактивировать ингибированный фермент непосредственно в организме [152—154]. Таким образом, между эфирами холина, фосфорорганическими инсектицидами и нуклеофильными реактиваторами имеют место конкурентные отношения.

Высокая специфичность указанных реакций и их тесная связь с механизмом токсического действия, равно как и клиническими проявлениями интоксикации, делают понятной исключительную диагностическую ценность холинэстеразного теста в этих случаях. Глубокое угнетение холинэстеразной активности крови, во всех случаях опережающее клинические проявления, служит, по общему признанию, наиболее ранним и специфичным диагностическим признаком острых и хронических отравлений новыми антихолинэстеразными агентами [142—148]. Избирательность и скорость протекания реакций между фосфорсодержащими веществами и ферментом столь высоки, что холинэстераза нашла применение в качестве наиболее чувствительного аналитического реактива для распознавания названной группы токсических агентов.

Наконец, определение холинэстеразной активности крови приобретает важное значение в клинике в связи с внедрением в лечебную практику обладающих курареподобным действием холиновых эфиров дикарбоновых кислот и некоторых антихолинэстеразных препаратов. В хирургической практике находят обоснованное применение дихолиновые эфиры янтарной кислоты (дитилин, сукцинилхолин,) пробковой кислоты и т. д. [155—159]. Эти препараты вызывают легко управляемое, кратковременное расслабление мышц, столь необходимое при проведении недлительных операций: эндоскопий, вправлений вывихов, установки отломков и т. п., а также при производстве операций на легких и сердце. Кратковременность и возможность регулирования действия дихолиновых эфиров в определенной степени основаны на их последующем гидролизе холинэстеразой крови. Однако клиническая статистика показывает, что в определенном проценте случаев, сопряженных с гипохолинэстераземиями, использование дихолиновых эфиров приводит к неожиданному резкому ухудшению общего состояния, длительному апноэ и даже гибели больного. В литературе имеются указания, что применение этих препаратов возможно лишь при условии контроля за уровнем холинэстеразной активности крови [157—159].

Близкие этим соображения можно высказать и в отношении применения антихолинэстеразных средств при миастенических кризах. Избыточное введение этих препаратов может вызвать переход миастенического криза в холинергический, при котором дальнейшее применение антихолинэстераз угрожает жизни больного. Изложенные соображения подчеркивают особую актуальность разработки достоверных экспресс-методов контроля за холин-

эстеразной активностью непосредственно в кагге крови у операционного стола и у постели больного.

Значительно менее освещены в литературе физиологическая роль и границы изменений в гатологии специфической ацетилхлинэстеразы эритроцитов. Установлено, что этот фермент расщепляется преимущественно на строде эритроцитов, а при выделении стрмина большая часть хлинэстеразной активности переходит из гемслизата во фракцию данного белка [160, 161]. Достоверные изменения содержания данного фермента обнаружены при некоторых заболеваниях крови. В частности, понижение специфической хлинэстеразной строде эритроцитов имеет место при хронической гемолитической анемии с гемоглобинурией Маркиафава [161]. Предположение Сабине о возможности использования определения хлинэстеразной активности эритроцитов в качестве важного функционального теста состояния костного мозга в дальнейшем не получило подтверждения [162, 163].

Из состояний, связанных с увеличением хлинэстеразной сыворотки крови, клинический интерес представляет только нефротический синдром. При тяжелых нефрозах содержание хлинэстеразной сыворотки может увеличиться более чем в 3 раза. Причиной этого увеличения является повышение скорости протессинтетических процессов в печени, связанных со значительными потерями белков сыворотки крови с мочой. Избирательная потеря мелкодисперсной альбуминовой фракции приводит к накоплению в крови более грубодисперсных глобулиновых фракций [123—124]. Возможные нарушения хлинэстеразной активности при различных заболеваниях в наиболее общем виде отражены на рис. 4.

Выше было рассмотрено диагностическое значение лишь немногих получивших наибольшее распространение ферментных реакций. Разумеется, список этих реакций может быть значительно увеличен. Перспективным и полезным следует признать определение дегидрогеназы молочной кислоты и фосфогексоизомеразы в крови при ряде заболеваний печени и мышц, церуплазмина при гепатолентикулярном циррозе Вильсона, каталазы ткани печени при раке и т. п. Однако уже приведенные примеры позволяют прийти к выводу о значительной диагностической ценности ферментных тестов. Принципиальная возможность проведения количественной оценки содержания в крови даже весьма незначительных количеств, поступающих из тканей ферментов по биокаталитическому эффекту, определенная степень специфичности их качественной и количественной топографии в тканях организма выгодно отличают ферментные тесты от других методов патохимического анализа крови.

В то же время необходимо подчеркнуть, что ферментные диагностические методы не должны переоцениваться и что в общем плане клинической диагностики им принадлежит лишь вспомогательная роль. Рациональное использование данных методов возможно только при четком понимании механизмов возникновения гипер- и гипсферментемий, равно как и при знании взаимоотношений нарушений активности отдельных ферментных систем при различных заболеваниях.

Приведем несколько примеров. Регистрация резкого повышения в сыворотке крови активности глутамат-аспартат-трансаминазы (равно как

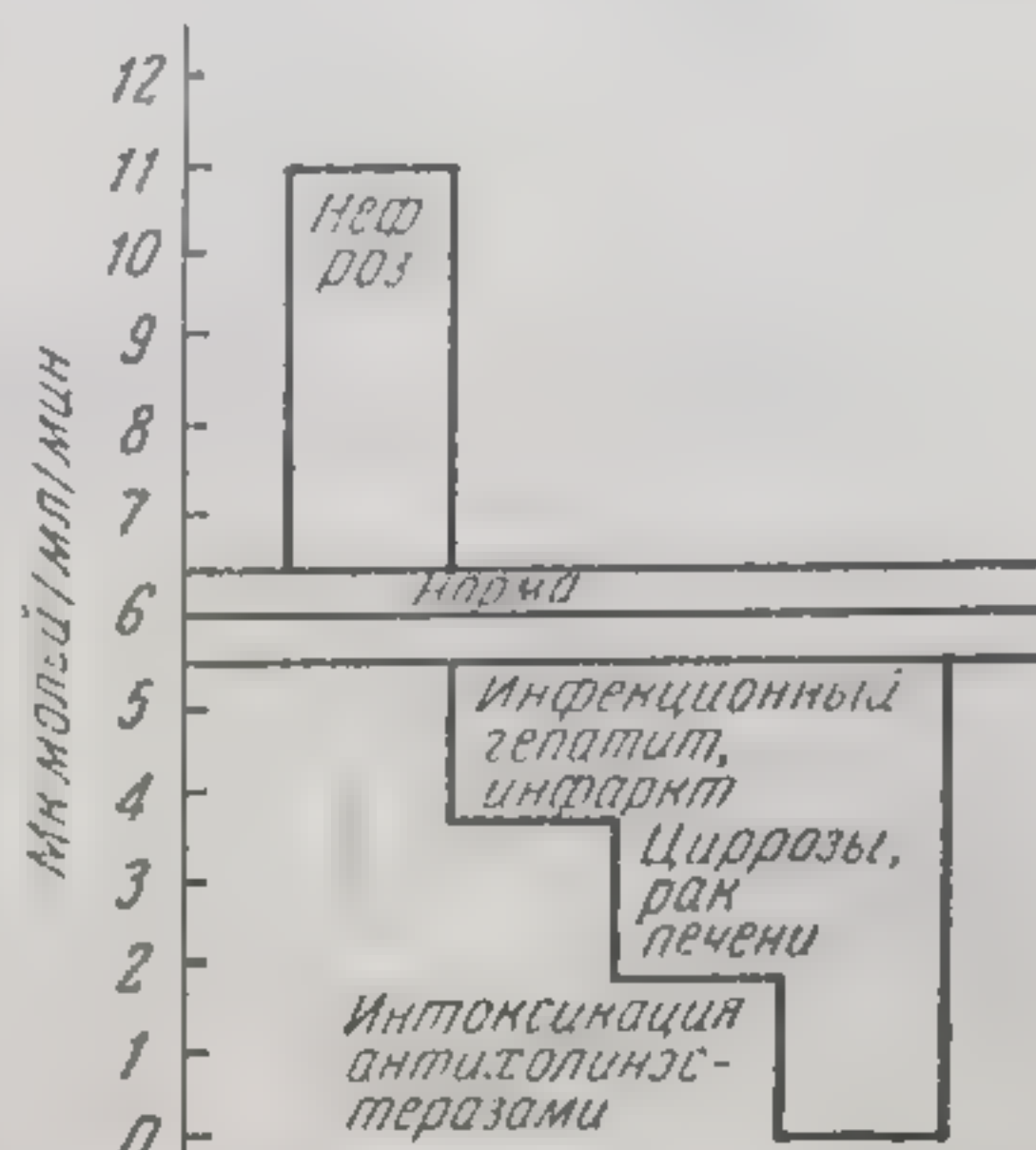


Рис. 4. Возможные изменения активности неспецифической хлинэстеразы при некоторых заболеваниях.

и дегидрогеназы молочной кислоты) может считаться ценным диагностическим признаком при дифференциации инфаркта миокарда от функциональных нарушений сердечной деятельности. Однако тот же показатель имеет

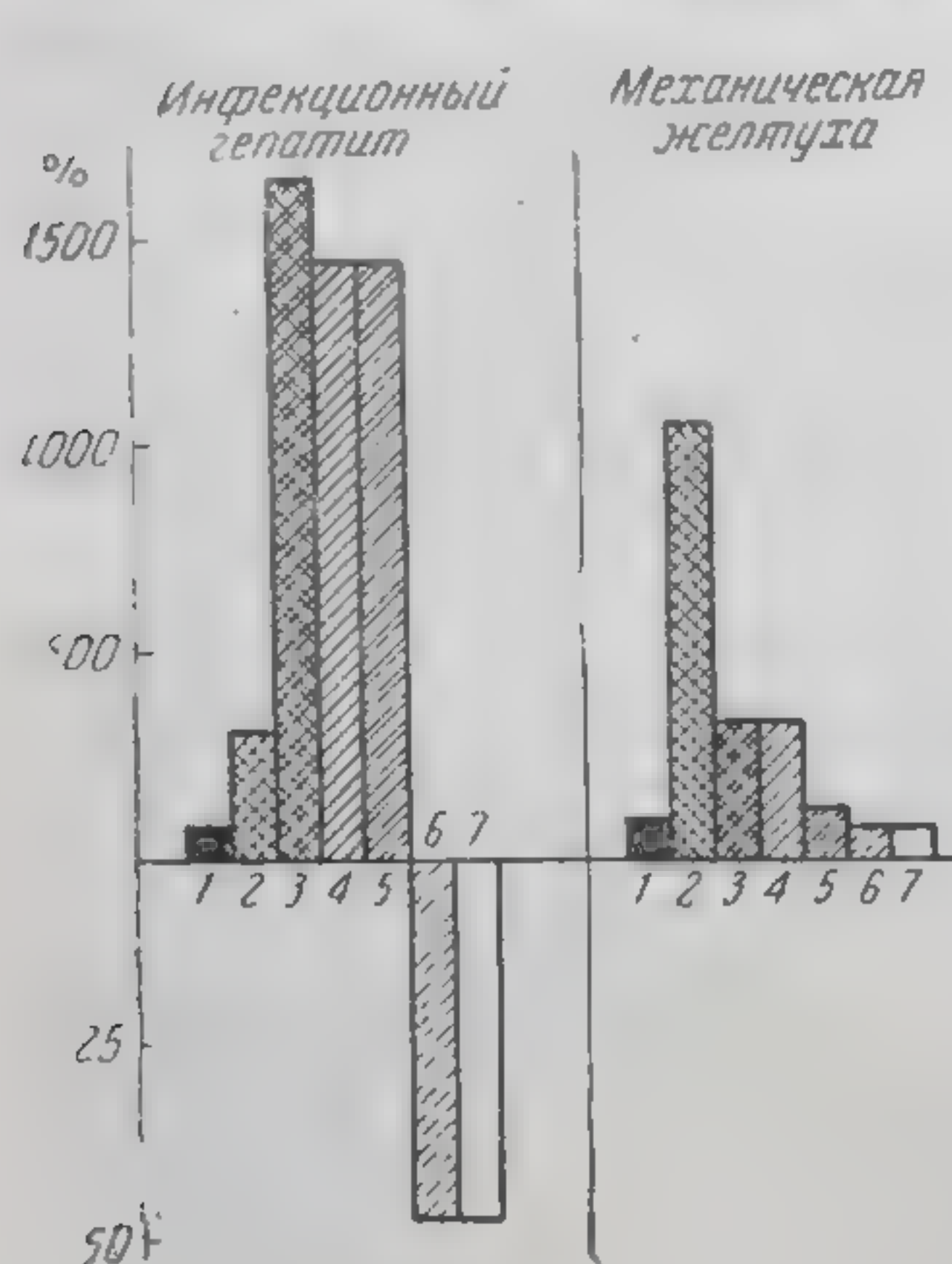


Рис. 5.

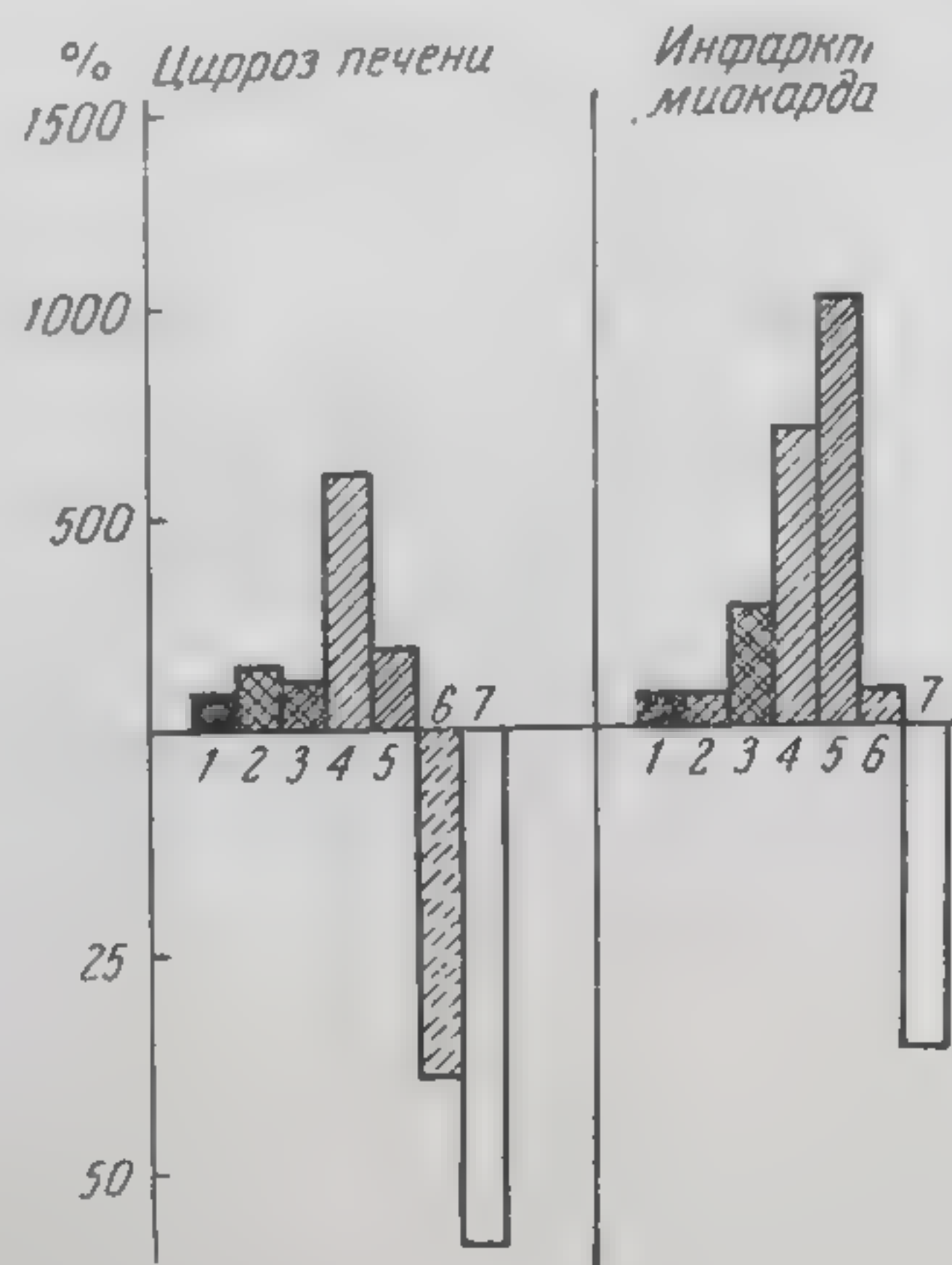


Рис. 6.

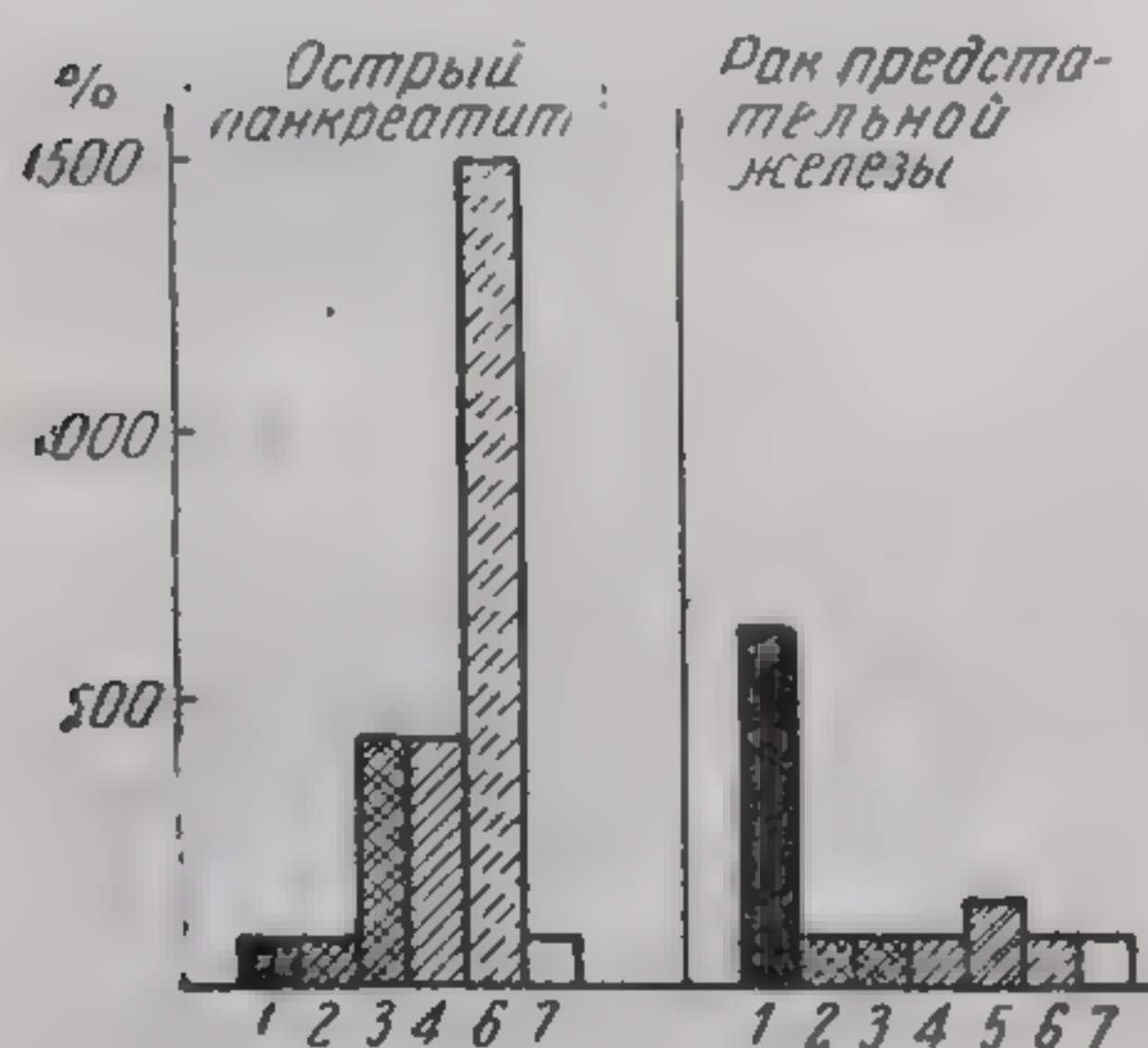


Рис. 7.

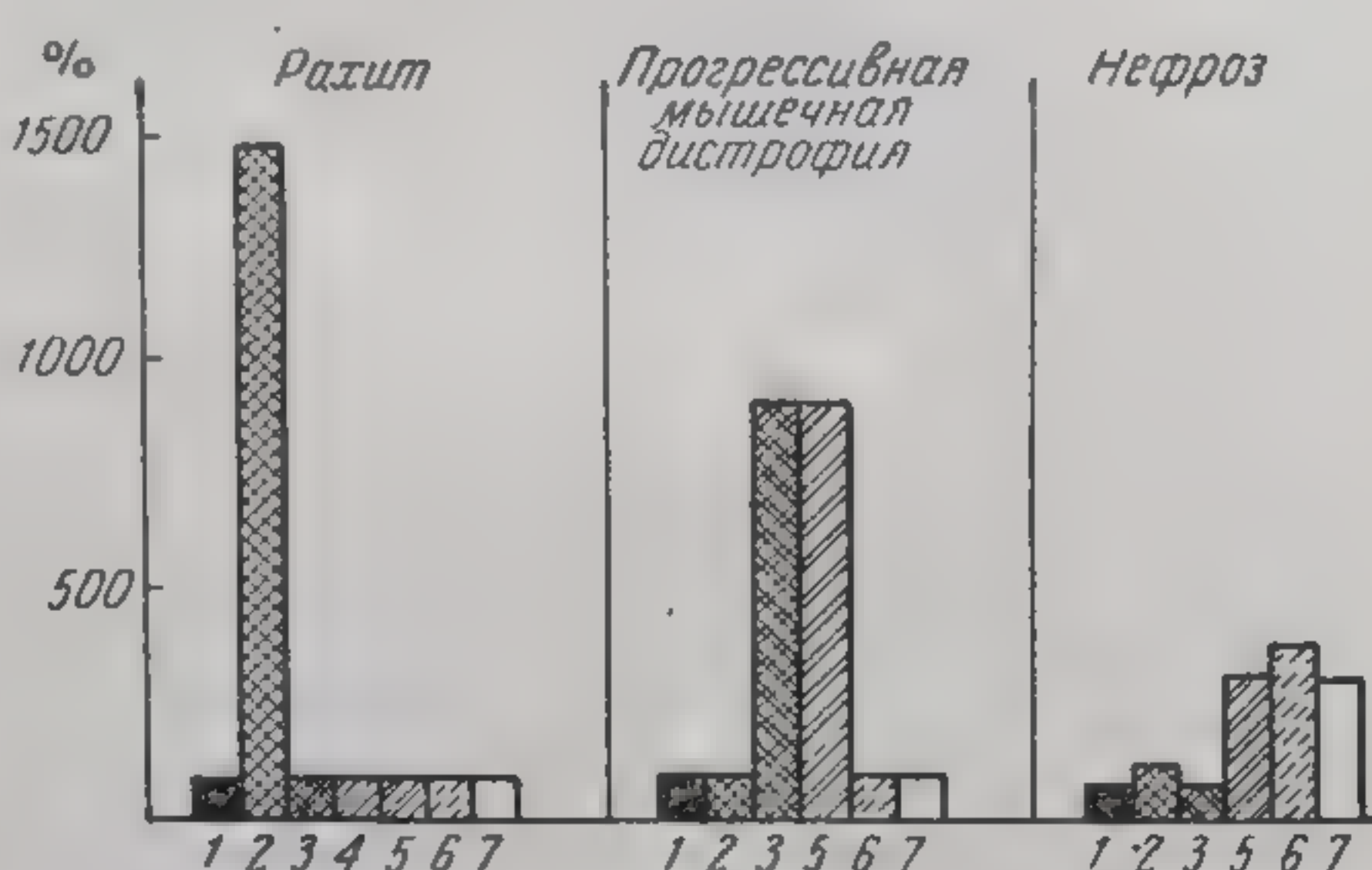


Рис. 8.

Рис. 5. Ферментные спектры крови при инфекционном гепатите и механической желтухе.

Рис. 6. Ферментные спектры крови при циррозе печени и инфаркте миокарда.

Рис. 7. Ферментные спектры крови при остром панкреатите и раке простатической железы.

Рис. 8. Ферментные спектры крови при рахите, прогрессивной мышечной дистрофии и нефрозах.

1 — фосфомоноэстераза II; 2 — фосфомоноэстераза I; 3 — глютамат-аспартат-трансаминаза; 4 — глютамат-аланин-трансаминаза; 5 — альдолаза; 6 — амилаза; 7 — бутирилхолинэстераза.

ограниченную ценность при дифференциации инфаркта миокарда от инфаркта легкого, так как гипертрансаминаземия может возникать при обоих заболеваниях.

Определенную пользу для ориентировки врача в вопросах диагностической ценности ферментных реакций может, по нашему мнению, оказывать представление интегральных данных о характере изменений активности различных ферментов при конкретных заболеваниях. Иными словами, установление взаимосвязей между изменениями активности отдельных ферментов при том или ином заболевании. Мы сделали попытку представить эти ферментные спектры крови, отражающих в самом общем виде тенденции изменений ее биокаталитических систем при отдельных заболеваниях.

На представленных ниже рис. 5—8 отражены изменения активности только рассмотренных ранее ферментов. Для единообразия степень отклонений выражена в процентах по отношению к нормальным величинам, которые нанесены на ось ординат. На рис. 5—6 отражены ферментные спектры крови при заболеваниях печени. Хорошо видно, что ферментный спектр при инфекционном гепатите (рис. 5) характеризуется резким увеличением активности альдолазы, обеих трансаминаз, а также некоторым понижением активности бутирилхолинэстеразы и амилазы.

При механических желтухах (рис. 5) характерно резкое нарастание активности фосфомоноэстеразы I. Ферментный спектр при циррозах (рис. 6) характеризуется прежде всего значительным понижением активности бутирилхолинэстеразы и амилазы. Таким образом, при трех видах заболеваний печени иногда с близкой клинической картиной имеют место значительные различия в ферментных спектрах, отражающих в определенной степени сущность нарушений течения биохимических процессов в тканях больного организма. Не менее показательными являются ферментные спектры других заболеваний, представленные на рис. 7—8.

Приведенные графики не оставляют сомнений в том, что ферментные спектры в определенной степени повышают диагностическую ценность отдельных ферментных тестов. В результате каждое заболевание получает более полную ферментную характеристику и биохимический профиль болезни вырисовывается более четко.

Диагностическая ценность ферментных спектров может быть повышена путем выведения коэффициентов, отражающих взаимоотношение активностей различных ферментов, например, трансаминаз (глутамат-аспартат-трансаминазы к глутамат-аланин-трансаминазе) или холинэстераз (специфической к неспецифической) и т. п.

В заключение следует отметить, что часто, оценивая значение ферментных методов, базируются только на данных статистического подтверждения или неподтверждения совпадения результатов ферментного теста с клиническим диагнозом. Думается, что это упрощенный подход к возможностям ферментных методов диагностики. Ферментные методы позволяют выявлять дополнительные особенности протекания болезни в каждом конкретном случае; они расширяют возможности суждения о патологическом процессе, порой приближая его к уровню молекулярной патологии, как это было показано при интоксикации. Можно не сомневаться в том, что ферментные методы в ряде случаев позволят найти и подсказать врачу новые подходы в дифференциальной оценке состояния двух больных, имеющих один и тот же диагноз. Особенно много следует ожидать от проведения исследований ферментной активности в динамике при условии изучения не одного, а нескольких ферментов.

Таким образом, значительная ценность ферментных диагностических методов не вызывает сомнений. Можно с уверенностью сказать, что мы находимся лишь у истоков большой перспективной отрасли биохимии — клинической энзимологии и что вскоре появится много новых ферментных диагностических тестов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Enzimi in medicina. Simpos. International. Milano, 1958.
2. Hauss W., Gerlach U., Schurmeyer E. Dtsch. med. Wschr., 1958, 83, No 31, 1310.
3. Abderhalden R. Klin. enzymolog. Stuttgart. G. Thieme. Verlag., 1958.
4. Hauck J. Med. Ann. Distr. Columbia, 1959, 28, No 1, 1.
5. Мардашев С. Р. Энзимология опухолей. М., 1948.
6. Keiding R. Scand J. clin. a. Lab. Investig., 1959, 11, No 1, 106.
7. Kowlessar O., Pert J., Haefner L., Slesinger M. Proc. soc. exptl. biol. a. med., 1959, 100, No 1, 191.
8. Vincent D., Segonzac G. Compt. rend. soc. biol., 1958, 152, No 12, 1819.
9. Rosenberg J. J. clin. Investig., 1959, 38, No 5, 630.
10. Latner A., Smith A. Lancet., 1958, 2, No 7053, 915.
11. Keclik M., Bures Z., Malis F., Skachova J. Vnitřni lékařství, 1958, 4, No 9, 821.
12. Gutman A., Olson K., Gutman E., Flood C. J. clin. Investig., 1940, 19, 129.
13. Блюгер А. Советская медицина, 1957, № 12, 78.
14. Bruns F., Jacob W. Klin. Wschr., 1953, 43/44, 1041.
15. Mendelson M., Bodansky O. Cancer., 1952, 5, 1.
16. Bodansky O., Jaffe H. Amer. J. Dis. Childr., 1934, 48, 1268.
17. Corner B. Arch. Dis. Childr., 1944, 19, 68.
18. Gsell O., Boesch F. Praxis, 1948, 37, 223.
19. Koller F., Rosenmund H., Zuppinger A. Helv. med. acta., 1948, 15, 356.
20. Franseen C., McLean R. Am. J. canc., 1956, 24, 299.
21. Bonner C., Homburger F., Smithy G., Borges P. JAMA, 1957, 164, 1070.
22. Curnow D., Riley W. Med. J. Australia, 1958, 2, No 15, 493.
23. Ohkubo T., Itoi S., Kusunoki T. Urol. Internat., 1958, 7, No 4, 184.
24. Raabe S. Zbl. Chir., 1952, 77, 1888.
25. Fishman W., Bonner C., Homburger F. New England J. Med., 1956, 255, 925.
26. Boghich O., Presenti Del Thei G. Arch. ospedale mare, 1958, 10, No 4, 423.
27. Браунштейн А. Е., Крицман М. Г. Биохимия, 1937, 2, 859.
28. Браунштейн А. Е. Биохимия аминокислотного обмена. М., 1949.
29. Браунштейн А. Е. Главные пути ассимиляции и диссимиляции азота у животных. Издательство АН СССР, 1957.
30. Rosa J., Saddi R., Shapira G. Compt. rend. soc. biol., 1958, 152, No 3, 422.
31. Seyela M. Cas. lek. ces., 1958, 97, No 40, 1255.
32. LaDue J., Wroblewski F. Science, 1954, 120, 497.
33. Пасхина Т. Письмо методическое Института биологической и медицинской химии АМН СССР, 1959.
34. Agress C. Am. J. Cardiol., 1959, 3, No 1, 74.
35. Berconsky J., Litvak B., Lippenholtz L. Prensa med. Arg., 1958, 45, No 42, 3331.
36. Berconsky J., Litvak B., Lippenholtz L. Prensa med. Arg., 1958, 45, No 14, 1442.
37. Arch. Internat. Med., 1956, 99, 556.
38. Chinsky M., Wilff R., Sherry S. Am. J. Med. Sci., 1957, 233, 400.
39. Wroblewski F. Amer. Heart J., 1957, 54, 219.
40. Оленичева Л., Эйзенгарт Р. Вопросы медицинской химии, 1959, 5, № 2, 124.
41. Bruce R., Todd J., Le Dune. Brit. med. J., 1958, No 5105, 1125.
42. Vannotti A. Enzimi in med., 297.
43. Kraska T., Golaszewski T., Szemplinska H., Szenberg A. Kardiol. polska 1, 1958, No 3, 329.
44. Paget M. Ann. biol. clin., 1953, 16, No 7—9, 408.
45. Dubach U. Triangel, 1958, 3, No 6, 234.
46. Barron D., Alexander C., Bell J., Oakley C. Quart J. Med., 1953, 27, No 103, 533.
47. Zapfe H. Artzl. Wschr., 1958, 13, No 47, 1032.
48. Burstein J., Harjanne A. Acta med. Scand., 1959, 163, No 3, 175.
49. Wroblewski F., LaDue J. JAMA, 1956, 160, 1130.
50. Wroblewski F., Rueggesser P., LaDue J. Science, 1956, 123, 1122.
51. De Ritis, Coltort M., Giusti G. Clin. chim. acta, 1959, 4, No 2, 213.
52. De Ritis F. F. Enzimi in med. (см. No 1).

53. De Ritis F. *Minerva med.*, 1958, 49, No 36, 1757.
54. Zelman S., Wang Chiche. *Am. J. Med. Sci.*, 1959, 237, No 3, 323.
55. Weisiger B. *Virgin. med. monthl.*, 1959, 86, No 3, 144.
56. Molander D., Sheppard E., Payne M. *JAMA*, 1957, 163, 1461.
57. Bobek K., Petera V., Lahn V. *Z. ges. inner med.*, 1958, 13, No 22, 887.
58. Бобек К., Петрова В., Лан В., Индра Я., Карличек В. *Клиническая медицина*, 1959, 37, № 1, 38.
59. Janousek S. *Cosop Lekar cesk.*, 1959, 98, No 7, 206.
60. Ferrari V. *Arch. sci. med.*, 1957, 104, No 2, 176.
61. Koskinen P., Antila L. *Ann. med. exptl. et biol.*, 1958, 36, No 3, 300.
62. Lippi M., Sebastiani A. *Arch. ital. sci. med. trop.*, 1958, 39, No 5, 271.
63. Boghich O., Presenti del Thei C. *Arch. ospedale mare.*, 1958, 10, No 4, 423.
64. Вольгемут И. *Врачебное дело*, 1927, 22.
65. Madsen S., Bang N., Iversen K. *Brit. med. J.*, 1958, No 5070, 543.
66. Del Keskamp A., Schmidt F., Schmidt E. *Dtsch.med. Wschr.*, 1959, 84, No 5, 188.
67. Foulk W., Fleisher G. *Gastroenterology.*, 1958, 35, No 4, 375.
68. Andress C. *Chirug. ital.*, 1958, 10, No 6, 234.
69. Murphy E., Cherniak M. *Pediatrics*, 1958, 22, No 6, 1110.
70. Isrueh H., Goldstein F. *Ann. Intern. Med.*, 1957, 47, 202.
71. Goldstein F. *New England J. Med.*, 1956, 254, 746.
72. Вотчал Б., Магазанник Н. *Клиническая медицина*, 1959, № 12, 37.
73. Dubach H. *Helv. med. Acta.*, 1958, 25, No 4, 470.
74. Ostrow B., Steinberg D., Ticktin H., Polis G., Evans J. *Circulation*, 1956, 14, 790.
75. Lonasescu V., Soimu J., Magda S., Floru S. *Studii si cercetari neurol. Acad. RPR*, 1959, 4, No 1, 15.
76. Bruns F., Jacob W. *Klin. Wschr.* 1954, 32, 1041.
77. Bruns F., Puls W. *Klin. Wschr.*, 1954, 32, 656.
78. Weyer F. *Aerztlich Labor.*, 1956, 2, 451.
79. Katz R., Ducci H. *Amer. J. Digest Dieas*, 1958, 3, No 7, 517.
80. Cajal N., Boern V., Baba C. *Studii si cercetari intramicrobiolog. microb. si parasitollog.*, 1958, 9, No 1, 9.
81. Yvany J. *Wiener Z. inn. med.*, 1958, 39, No 6242.
82. Bruns F. *Biochem. Z.* 1954, 325, 429.
83. Bruns F., Neuhaus J. *Biochem. Z.*, 1955.
84. Товарницкий В., Волуйская Е. *Лабораторное дело*, 1955, № 6, 7.
85. Товарницкий В., Волуйская Е. *ЖМЭИ*, 1955, 10, 67.
86. Германюк И. *Советская медицина*, 1958, 11, 63.
87. Volk B., Losner S., Aranson S., Lew H. *Am. J. med. Sci.*, 1956, 232, 38.
88. Уланович Ф. *Лабораторное дело*, 1959, 2, 3.
89. Некрасова А. В кн.: *Атеросклероз и инфаркт миокарда*. Медгиз, 1959, стр. 304.
90. Rafalowicz A., Müller J., Soldaj H., Wolanska A. *Polsk tygod lekar.*, 1959, 14, No 1, 4.
91. Дрейфус Ж., Шапир Г., Шапир Ф., Демю. *Вопросы медицинской химии*, 1958, 4, № 2, 97.
92. Evans J., Baker R. *Brain*, 1957, 80, No 4, 557.
93. White L. J. *nat. cancer. Inst.*, 1958, 21, No 4, 671.
94. Шелухина Л., Панина А. *Терапевтический архив*, 1957, 9, 78.
95. Sibley J., Higgins G., Fleisher G. *Arch. Path.* 1955, 59, 712.
96. Wohlgemuth J. *Berl. klin. Wschr.*, 1910, 47, 92.
97. Elman R. *JAMA*, 1942, 118, 1265.
98. Elman R. *Surg. gyn. obstetr.*, 1955, 100, 241.
99. Burnett W., Ness T. *Brit. med.* 1955, 2, 770.
100. Budd J., Walter K., Harris L., Knight W. *Gastroenterology*, 1959, 36, No 3, 333.
101. McGeachin R., Lewis J. J. *biol. chem.*, 1959, 234, No 4, 795.
102. Орлов В., Георгиевский В., Коробова З. *Сборник научных работ студентов Курского медицинского института*, 1958, 4, 94.
103. Лепорский Н. *Болезни поджелудочной железы*. Медгиз, 1951.
104. Lilljekvist R. *Acta chirurg. scand.*, 1958, 115, No 6, 433.
105. Abruzzo J., Нотам М., Нокс Дж., Коффи Р. *Ann. Surg.*, 1958, 147, No 6, 921.
106. Short D. *Scott med. J.*, 1958, No 1, 305.
107. Malinowski T. *JAMA*, 1952, 149, 1380.
108. Heiletz C., Probststein C., Gray S. *Arch. Intern. Med.*, 1941, 67, 819.

109. Ballon H., Nilloff P. *Canad med. assoc. J.*, 1959, 80, No 5, 339.
110. Candel S., Wneelock M. *Ann. int. Med.*, 1946, 25, 88.
111. Dunlop G. *Lancet*, 1933, 2, 183.
112. Wohlgemuth J. *Z. urol.*, 1911, 5, 801.
113. Harrison G., Lawrence R. *Lancet*, 1923, 1, 169.
114. Lagerlof H., Perman G. *Acta chir scand.*, 1955, 111, 22.
115. Knight W., Nuether R., Sommer A. *Gastroenterology*, 1949, 12, 34.
116. Sowogyi M. *Proc. soc. exper. biol. med.*, 1934, 32, 538.
117. Gray S., Probststein J., Heifetz C. *Arch. intern. med.*, 1941, 67, 807.
118. Grouchy J. *Rev. franc. etud. clin. biol.*, 1958, 3, No 8, 881.
119. Augustinsson K. *Nature*, 1958, 181, 1786.
120. Покровский А. *Военно-медицинский журнал*, 1960, 1, 34.
121. Покровский А. *Биохимия*, 1959, 24, 291.
122. Antopol W., Tuchman L., Schiffrin A. *Proc. soc. exper. biol. med.*, 1938, 38, 363.
123. Farber M. *Acta med. Scand.*, 1942, 114, 72.
124. But H., Comfort M., Dry T., Ostberg A. *J. lab. clin. med.*, 1942, 27, 649.
125. Kunkel H., Ward S. *J. exper med.*, 1947, 86, 325.
126. McArdle B. *Quart J. med.*, 1940, 33, 107.
127. Vorhaus L., Kark R. *Am. J. Med.*, 1953, 14, 707.
128. Вомо Е., Chirico M. *Arch. Path. clin. med.*, 1954, 31, 200.
129. Заславская Р. *Терапевтический архив*, 1954, 26, № 4, 72.
130. Kaufman K. *Ann. internat. med.*, 1954, 41, 533.
131. Sleisinger M., Almy T., Gilder H., Parla G. *J. clin. Intestig.*, 1953, 32, 466.
132. Moore C., Birchell R., Horack H., Batson H. *Amer. J. med. Sc.*, 1957, 234, 538.
133. Wani P., Ramachandren S., Navani H. *Indian. J. med. Reas* 1959, 1, 13.
134. Sawitsky A., Fitch H., Meyer K. *J. lab. a clin. med.*, 1949, 34, 178.
135. Heinecker R., Meyer J. *Klin. Wschr.*, 1957, 35, 340.
136. Vorhaus L., Scudamore H., Kark R. *Gastroenterology*, 1950, 15, 304.
137. Bertolini A., Gardenmagner C., Massari N. *Acta Vitamin*, 1959, 13, No 1, 13.
138. Orlovsky M., Kotlarek-Haus S. *Polsk. tyg. lekar.*, 1958, 13, No 44, 1713.
139. Шувалова Е. *Ученые записки I Ленинградского медицинского института*, 1958, 3, № 2, 115.
140. Celice J. *Bull. acad. nat. med.*, 1959, 143, No 1, 30.
141. Саляев В., Столярчук А., Ушаков Г. *Врачебное дело*, 1958, № 9, 903.
142. Kole G., Gillman A. *Pharmacol. Rev.*, 1949, 95, 166.
143. Augustinsson K. В кн.: *Enzymes* под ред. Summer a Myrback, 1950, 1, 443, No V.
144. Aldridge W. *Biochem*, 1953, 53, 62.
145. Green L. *Biochem. Pharmacol.*, 1958, 1, No 2, 115.
146. Metcalf R. *Organic Insecticides*. N. V. 1955.
147. Schrader G. *Angew. Chem. u. Chem. Ing. Techn.*, 1952, No 62, 18.
148. Покровский А. *Вопросы медицинской химии*, 1958, 4, 292.
149. Schaffer N., May S., Summerson W. *J. Biol. chem.*, 1954, 206, 201.
150. Schaffer N., May S., Summerson W. *J. biol. chem.*, 1953, 202, 67.
151. Neurath H., Schwert G. *Chem. Rev.*, 1950, 46, 69.
152. Wilson I. *J. Biol. chem.*, 1950, 190, 111.
153. Wilson I., Ginsburg S. *Biochim. biophys. acta*, 1955, 18, 168.
154. Davies D. Green A. *Advanc. in Enzym.*, 1958, 20, 283.
155. Brucke F. *Pharm. rev.* 8, 2, 265.
156. Рыболовлев Р. *Сб. Физиологическая роль ацетилхолина. Л.*, 1958.
157. Nuller M. *Nervenartz*, 1953, 24, 64.
158. Hodson D., Kothari P. *Brit. med. J.*, 1952, 2, 442.
159. Reid J., Neill D. *Lanzet*, 1952, 2, 1233.
160. Carta S., Vivaldi G. *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 1958, 34, 1739.
161. De Sandre G., Chiottio G. *Helv med. acta*, 1958, 25, 235.
162. Sabine J. *J. clin. Investig.*, 1940, 19, 833.
163. Pritchard J., Weisman R. *J. lab. clin. med.*, 1956, 47, 98.
164. Покровский А. *Фармакология и токсикология*, 1948, № 1.

2. О МЕХАНИЗМЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ С ФЕРМЕНТНЫМИ СИСТЕМАМИ

А. А. Покровский

Исследования последних лет обострили интерес широкого круга биологов к проблеме природы химического взаимодействия ядов с ферментами и доказали высокую продуктивность теоретических исследований в этой области для решения задач практической медицины. Рассматривая закономерности взаимодействия ядов с ферментами, мы затрагиваем, по-видимому, основные принципы стратегии современной химиотерапии.

Можно с уверенностью сказать, что в настоящее время ни в одной другой области патологии биохимия не в состоянии столь близко подойти к изучению патогенетической природы патологического процесса на молекулярном уровне, как в случае воздействия на организм ядовитых веществ.

При изучении биохимического механизма действия ядов экспериментатор в большинстве случаев имеет дело с веществами строго постоянного состава, часто с известной химической структурой, поддающимися точной дозировке. Токсические свойства многих ядов настолько характерны, что могут быть положены в основу биологического титрования. Яды являются достаточно удобными средствами изучения патологических процессов, позволяющими добиваться необходимого варьирования тяжести и высокой степени воспроизводимости клинических признаков интоксикации. Они позволяют производить избирательную «перерезку» отдельных метаболических путей, исключать определенные биохимические процессы в живом организме и тем самым выяснять их физиологическое значение.

В то же время яды являются тонкими инструментами, позволяющими «препарировать» функциональные структуры активных центров ферментов и порой с определенной точностью оценивать расстояния между отдельными функциональными группами в молекуле белка, которые, несмотря на некоторую степень свободы конформации и флюктуации пространственного расположения отдельных групп, все же способны к осуществлению акта биологического катализа только при соблюдении достаточно строгих условий пространственной конфигурации. Эта идея получила свое выражение в известных представлениях о принудительной конфигурации активных центров (Кошланд).

Задача настоящего обзора сводится к попытке обобщения и некоторой систематизации наиболее достоверных экспериментальных данных о влиянии токсических веществ на ферментные системы.

В настоящее время можно с уверенностью говорить о том, что подавляющее число ядов реализует свое токсическое действие путем глубоких нарушений в стройной сочетанной в пространстве и времени деятельности биокаталитических систем организма. Замечательные догадки и первые экспериментальные подтверждения ферментного механизма действия ядов были получены в начале 900-х годов в лабораториях корифеев отечественной биохимии И. П. Павлова и Н. П. Кравкова [1—3]. Биохимическими экспериментами последующих лет получены достоверные подтверждения правильности ферментной гипотезы. Значительные успехи биохимии в области выяснения сущности токсических процессов позволили Д. Э. Гринугиске сделать следующее общее положение: «Вещество, которое в следовых количествах оказывает глубокое воздействие на биологическую систему, либо само входит в состав тех или иных ферментов, либо повреждает некоторые из них» [4]. Анализ уже известных фактов позволяет говорить о значительно большем разнообразии механизмов реализации токсического действия ядов на

ферментные системы. Исходя из этого, мы предприняли попытку разделить яды, ферментный механизм действия которых представляется достаточно доказанным, на ряд групп, различающихся по структурным взаимоотношениям, возникающим в организме между молекулами яда, субстрата, кофермента и самим ферментом. Мы в полной мере понимаем предварительность представленной классификации, но в то же время считаем целесообразными попытки систематизации и обобщения накопленных фактов. По механизму действия ядов на течение ферментных реакций в организме мы разделяем их на 9 групп.

Первая группа, являющаяся наиболее многочисленной и изученной, включает структурные аналоги субстратов, непосредственно взаимодействующие с ферментами и подавляющие их активность по типу конкурентного торможения. Математическая интерпретация угнетения ферментных реакций, происходящего по типу конкурентного торможения, является относительно несложной [5, 6].

Скорость ферментной реакции в присутствии ингибитора конкурентного типа может быть охарактеризована следующим уравнением:

$$V_{In} = \frac{V [C]}{K_m + \left[K_m \cdot \frac{[I_n]}{K_{In}} \right] + [C]}$$

где: V_{In} — скорость ферментной реакции в присутствии ингибитора;

V — максимальная скорость ферментной реакции;

$[C]$ — концентрация субстрата;

$[I_n]$ — концентрация ингибитора и K_{In} — константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса.

K_m — константа Михаэлиса;

Очевидно, что уменьшение скорости исходной ферментной реакции в присутствии ингибитора будет тем больше, чем меньше величина константы диссоциации фермент-ингибиторного комплекса K_{In} , иными словами, чем больше сродство между ингибитором и ферментом. С другой стороны, эта величина будет тем больше, чем выше концентрация ингибитора в системе $[I_n]$. Соотношение скоростей одной и той же ферментной реакции в присутствии и отсутствии ингибитора может быть охарактеризовано следующим уравнением:

$$\frac{V_{In}}{V_0} = 1 + [I_n] \frac{K_m}{K_m + K_{In} [C]}$$

Таковы общие закономерности, характеризующие влияние ядов первой группы на ферменты. Особое значение структурных аналогов субстратов в изыскании новых химиотерапевтических средств делает целесообразным их более подробное рассмотрение.

В первой группе ядов наиболее изучены антихолинэстеразные соединения.

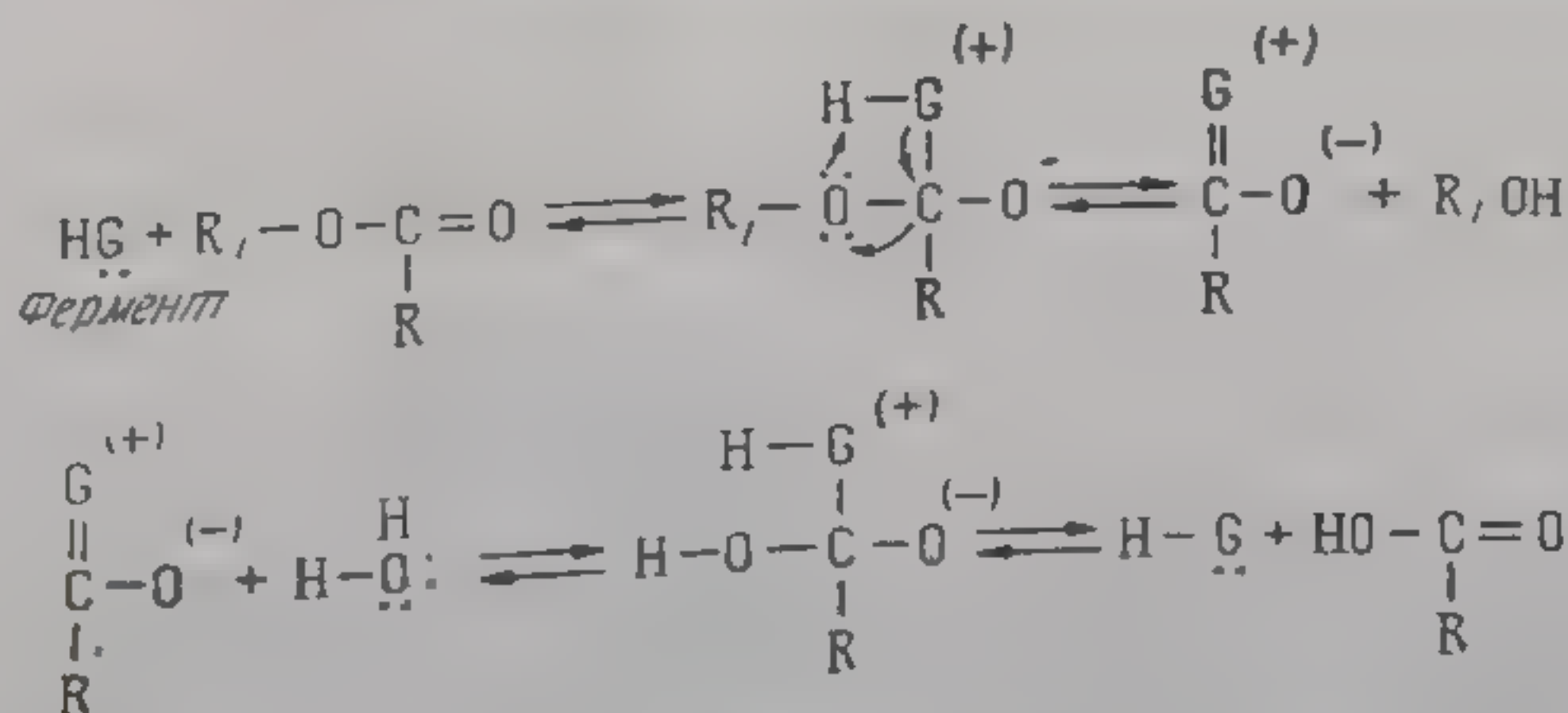
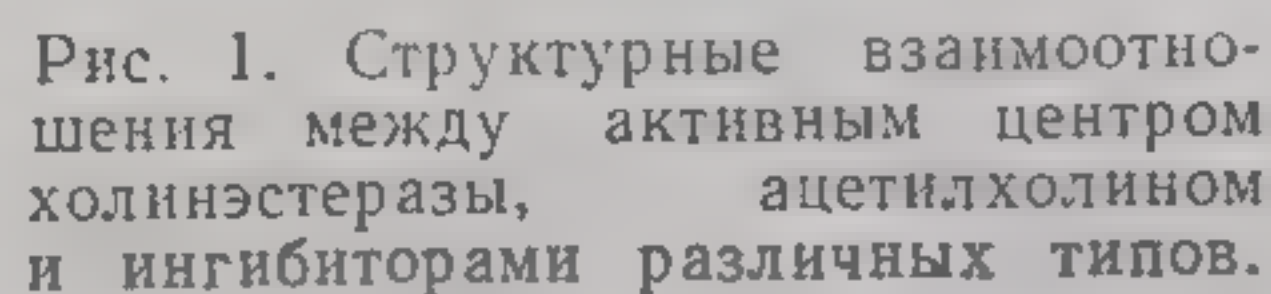
Доказано, что в физиологических условиях ацетилхолин в результате синтетических процессов, катализируемых холинацетилазой, накапливается в виде резервной рыхло связанной с белком неактивной формы [7, 8]. Под влиянием раздражителя медиатор освобождается из комплекса, преодолевает микропространство синапса и вступает во взаимодействие с холинорецептором. В результате происходит резкое изменение проницаемости поляризованной мембраны рецептора и генерируются биоэлектрические потенциалы.

и изучением
и модификации
конкурентно-
свойств реак-
ции относитель-
но конкурентного
ингибитора;
активации фер-

и реакции в
а константы
ловами, чем
стороны, эта
а в системе
и в присут-
следующим

дов первой
обстратов в
разным их
ные соеди-

результате
сплывается
7, 8]. Под
преодоле-
хотиноре-
ости поля-
не потян-



293

настоящее время составляет много сотен и продолжает непрерывно нарастать в связи с усиленным синтезом этих в высшей степени важных соединений [5, 173, 124].

Слева представлены так называемые ингибиторы обратимого типа, имеющие значительное структурное сходство с ацетилхолином, но сравнительно большие константы диссоциации фермент-ингибиторного комплекса.

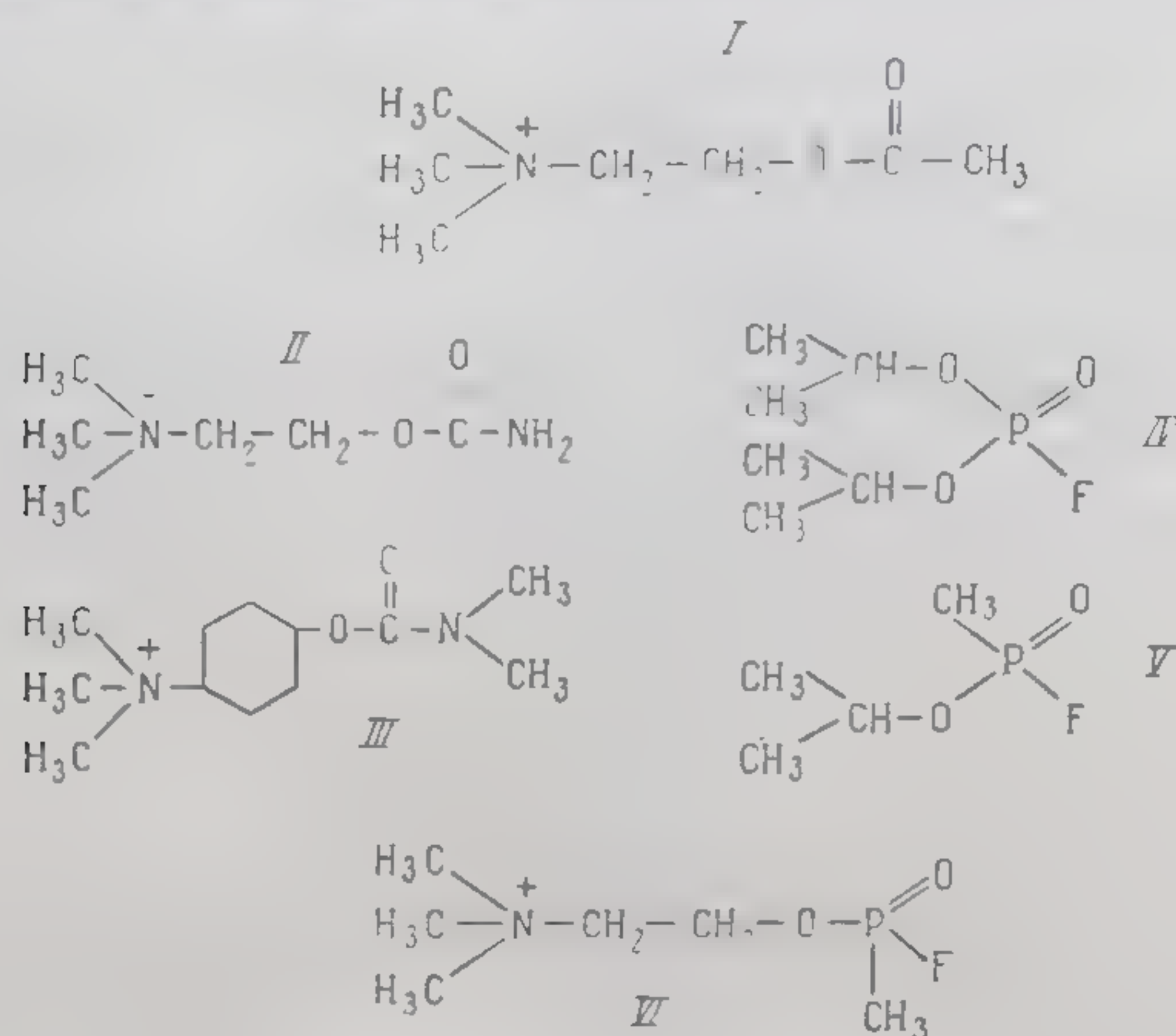
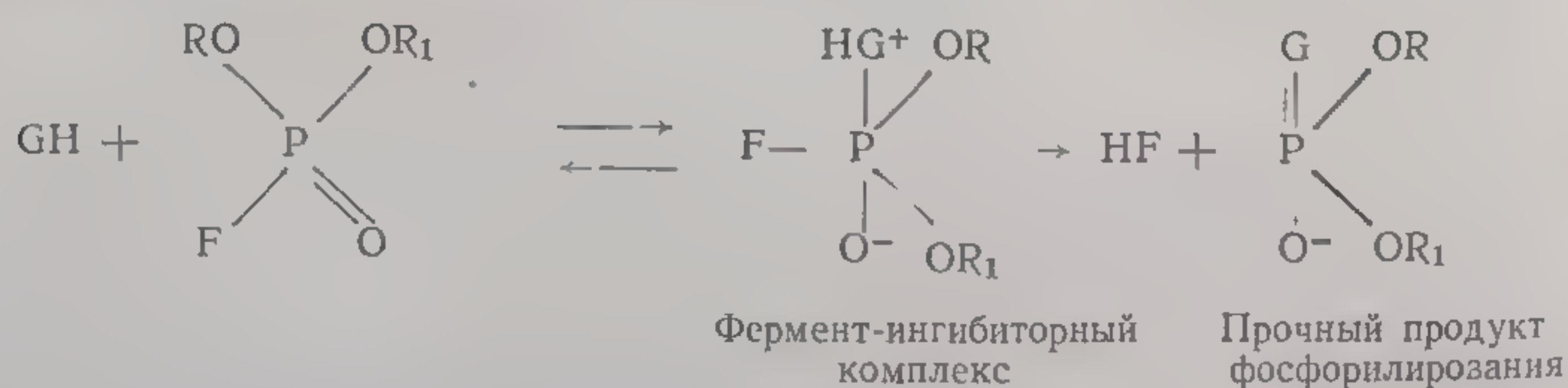


Рис. 2. Структуры основных типов ингибиторов холинэстеразы.

Тормозящий эффект прозерина во много раз выше, чем у карбаминоилхолина, антихолинэстеразное действие которого незначительно.

Справа представлены вещества из группы фосфорорганических ингибиторов холинэстеразы. Они также являются эфирами и в силу этого легко вступают во взаимодействие с нуклеофильной группировкой эстеразного центра фермента. Однако в результате возникает не легко гидролизующийся ацелированный фермент, а весьма устойчивый продукт его фосфорилирования.



Стойкость продукта фосфорилирования объясняет трудную обратимость этой реакции и высокую антихолинэстеразную активность фосфорсодержащих соединений. Нельзя не отметить, что соединения IV и V являются неполными структурными аналогами ацетилхолина, так как не содержат необходимого для взаимодействия с анионным центром фермента атома четвертичного азота. Направленный синтез подобного гибридного соединения, сочетающего в своем составе как фосфорилирующую группу, так и азотсодержащий спирт, был осуществлен шведским химиком Таммелином

[12]. Однако из соединений, описанных Таммелином, метил-фторфосфорилхолин обладает исключительно сильным антихолинэстеразным действием и высокой токсичностью. Пространственные взаимоотношения, возникающие между активным центром фермента и различными ингибиторами, представлены на рис. 1. Напомним, что прочность прикрепления фосфорильного остатка к ферменту в значительной мере способствовала выяснению природы пептидного фрагмента, принимающего участие в построении активного центра некоторых эстераз, трипсина и химотрипсина [19, 20]. Доказано, что главную роль в строении этого центра играет упорядоченное в пространстве сочетание гидроксила серина, карбонильной группы примыкающей к нему аспарагиновой или глутаминовой кислот, а также имидазольной группировки гистидина [7, 13]. Последней рядом авторов приписывается роль нуклеофильной группировки, осуществляющей первичное взаимодействие эстеразного центра с субстратом и ингибиторами.

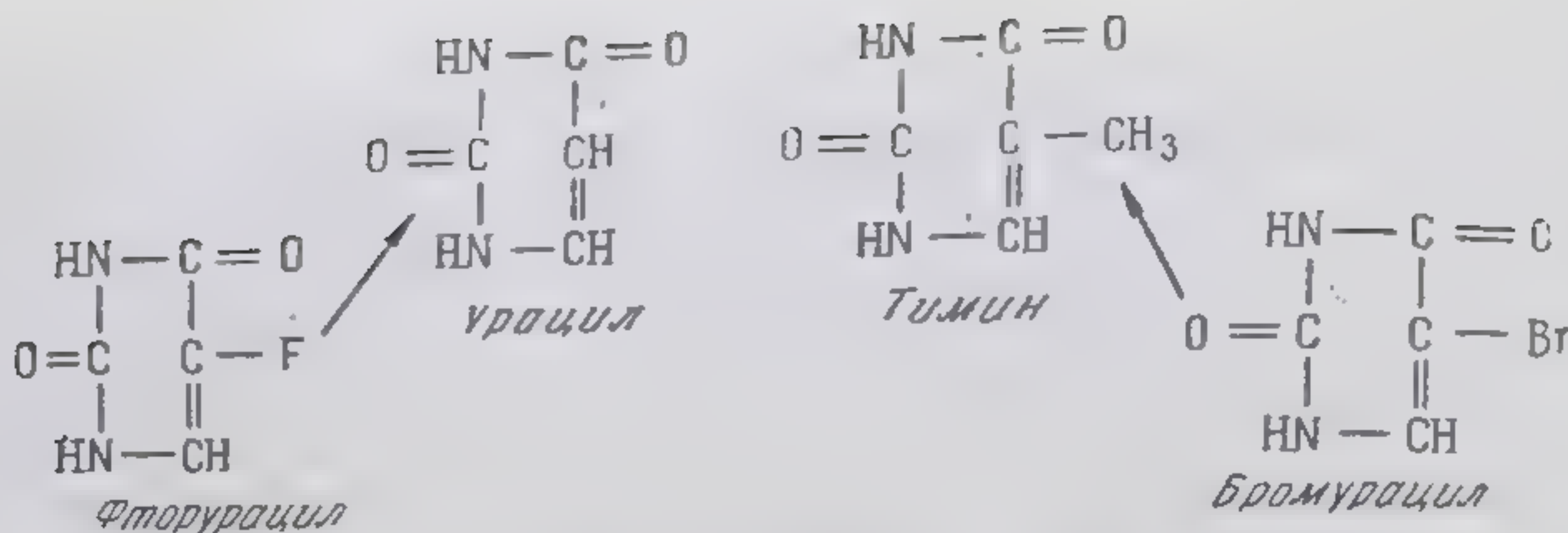
Завершая рассмотрение механизма токсического действия первой группы ядов, нельзя не упомянуть, что эти на первый взгляд чисто теоретические исследования достаточно быстро привели к направленному синтезу многих высокоэффективных противоядий.

Раз в основе действия определенной группы ядов лежит структурная аналогия между субстратом и ингибитором, приводящая к конкуренции между ними за связывание нуклеофильной группы фермента, то естественно казались попытки противопоставления этой вредной конкуренции полезной конкуренции за связывание молекулы яда между нуклеофильной группировкой фермента и еще более мощными нуклеофильными агентами, вводимыми в организм в качестве противоядий. Попытки создания подобных нуклеофильных соединений завершились успешным синтезом Вильсоном и затем рядом других авторов значительного числа эффективных антидотов, в числе которых следует упомянуть метиодид никотингидроксамовой кислоты, 2-пиридиальдоксим метиодида (2-ПАМ), изонитрозоацетона и др. [21—25].

Таким образом, на примере антихолинэстеразных соединений мы сравнительно подробно охарактеризовали механизм токсического действия структурных аналогов субстратов, действующих по типу конкурентного торможения. Структурная близость этих соединений к субстрату настолько велика, что они преодолевают «барьер специфичности» фермента и вступают с ним в соединение, образуя фермент-ингибиторный комплекс. Однако различие в их строении столь значительно, что образованный фермент-ингибиторный комплекс оказывается избыточно прочным и блокированный фермент выбывает из цепи биохимических реакций.

Яды этой группы, как правило, вступают в реакцию с ферментом через непродолжительное время после начала контакта. Благодаря этому для многих из них характерно быстрое развертывание клинической картины и бурное течение отравлений. Среди представителей первой и наиболее обширной группы ядов упомянем также структурный аналог янтарной кислоты — малоновую кислоту, многочисленные и имеющие важное практическое значение структурные аналоги серотонина — антисеротонины; структурный аналог фосфорной кислоты — мышьяковую кислоту, галоидные производные пирамидинов и пуринов и т. д.

Значительный интерес представляет соблюдение пространственного соответствия между структурными аналогами и субстратами, которое можно продемонстрировать на примере галоидзамещенных пиримидинов. Показано, что при замещении атома водорода ядра урацила в 5-м положении на различные галоиды удается получить производные, которые проявляют максимальное конкурентно-ингибирующее действие в отношении различных ферментных систем [26, 27].

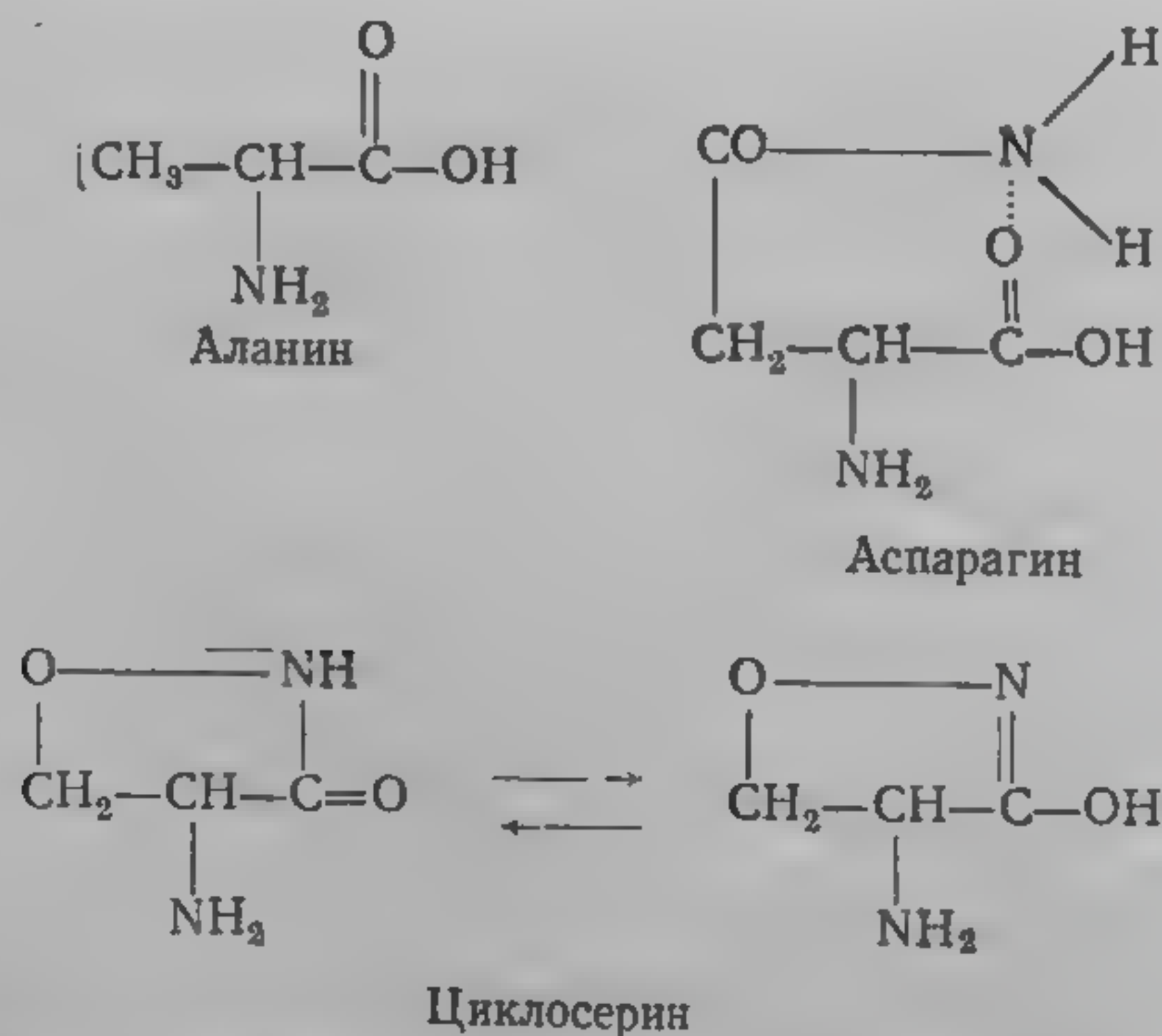


Так, фторзамещенный урацил проявляет свое максимальное действие по отношению к ферментным системам, участвующим в обмене урацила, бромзамещенный аналог уже в большей степени препятствует деятельности ферментных систем, участвующих в обмене тимина. По-видимому, значительно больший объем атома брома позволяет рассматривать 5-бромурацил в большей степени как структурный аналог тимина, в котором 5-е положение занято имеющей значительные «габариты» метильной группировкой.

Новый интересный пример значительной биологической и одновременно антитрансаминазной активности структурных аналогов был найден в последнее время в антибиотике циклосерине [28—30].

Установлено, что сильное ингибирующее действие на некоторые трансаминазы оказывает лишь один из оптических изомеров антибиотика, а именно L-циклосерин. Примечательно, что наиболее выраженный ингибирующий эффект L-циклосерин оказывает в отношении тех трансаминаз, с субстратами которых у него отмечается наибольшее структурное подобие: на L-аланин-глутамат-трансаминазу и трансаминазу L-аспарагина.

Величина ингибирующего действия L-циклосерина по отношению к данным ферментам на 2—3 порядка выше, чем по отношению к другим трансаминазам. Значительная структурная близость циклосерина и субстратов действия указанных ферментов L-аланина и L-аспарагина очевидна из следующих формул:



Вторая группа ферментных ядов также включает структурные аналоги субстратов, но синтез этих ядов катализируется ферментными системами самого организма из нетоксичных предшественников. Таким образом, механизм токсического действия второй группы должен быть охарактеризован как летальный синтез.

Одним из наиболее интересных примеров летального синтеза, связанных с нарушением нормального протекания реакций цикла трикарбоновых кис-

лот, является механизм токсического действия южноамериканского растения *Dichapetalum sumatense*. Из листьев этого растения, являющихся причиной частой гибели скота, Маресу впервые удалось выделить относительно значительные количества фторуксусной кислоты. Этот яд был подвергнут идентификации его действия на различных животных [31]. Наиболее чувствительными оказались собаки, токсичность фторацетата для которых оказалась выше, чем для крыс, примерно в 100 раз (0.05 мг/кг вместо 5.0 мг/кг) и в 10 000 раз выше, чем для лягушек (500 мг/кг). Характерно наличие относительно длительного латентного периода (периода биохимической подготовки), после которого наступают симптомы резкого перевозбуждения нервной системы — судороги и нарушения со стороны сердечной деятельности.

Вопреки ожиданиям, яд не оказывал в токсических концентрациях непосредственного действия ни на одну из изученных ферментных систем. В то же время Мартиус обнаружил при воздействии фторацетата резкое замедление исчезновения лимонной кислоты во взвеси тканевых срезов. А затем Питерс, Буффа и другие установили факт значительного увеличения содержания лимонной кислоты в тканях отравленных животных, которое было особенно выражено в почках, селезенке, сердце и мозге [32—34]. На основании этих данных Питерс выдвинул гипотезу летального синтеза, согласно которой сама фторуксусная кислота не обладает токсичностью. Более того, попадая в организм, она подвергается тем же ферментным превращениям, что и уксусная кислота (рис. 3).

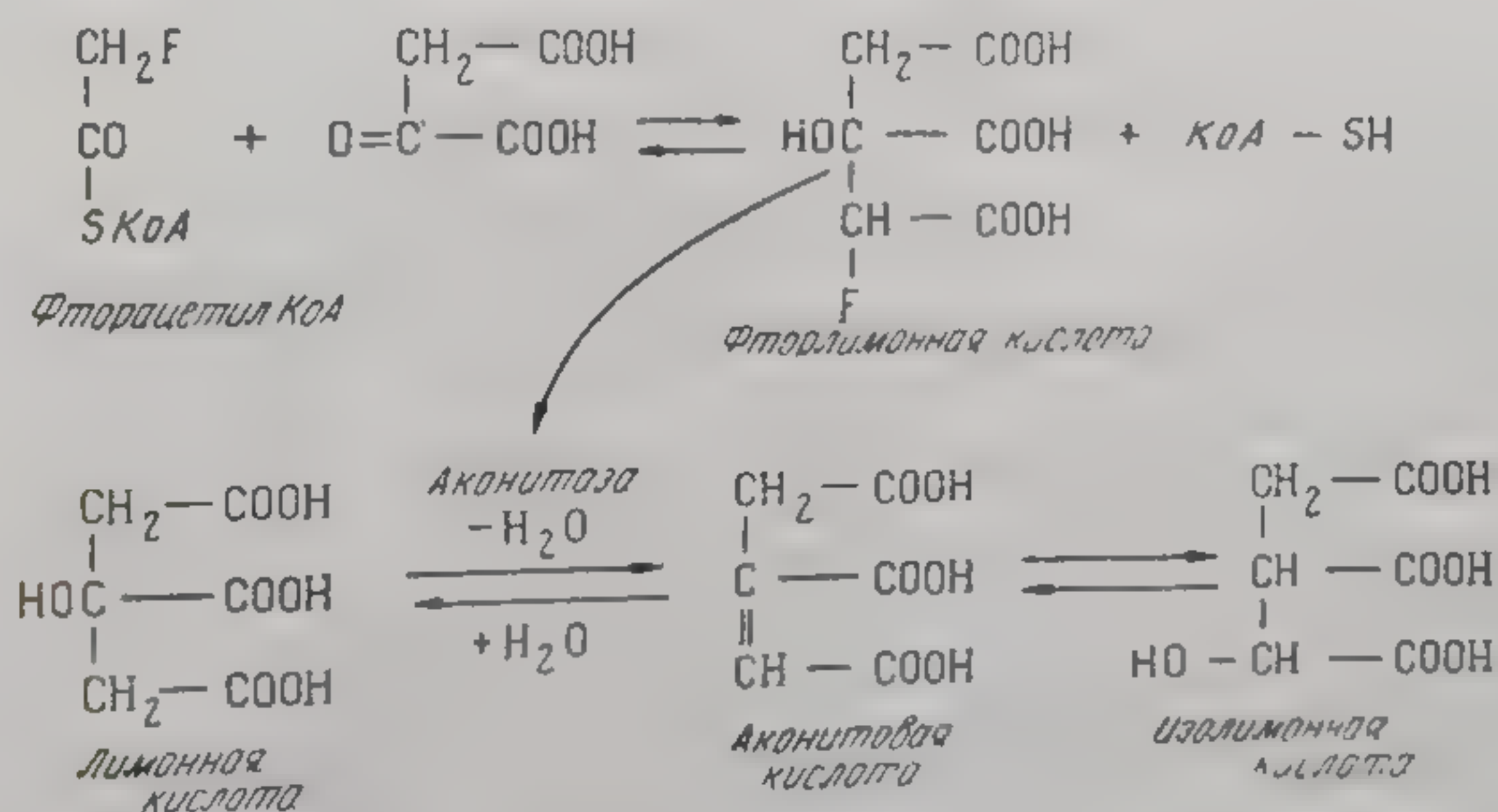
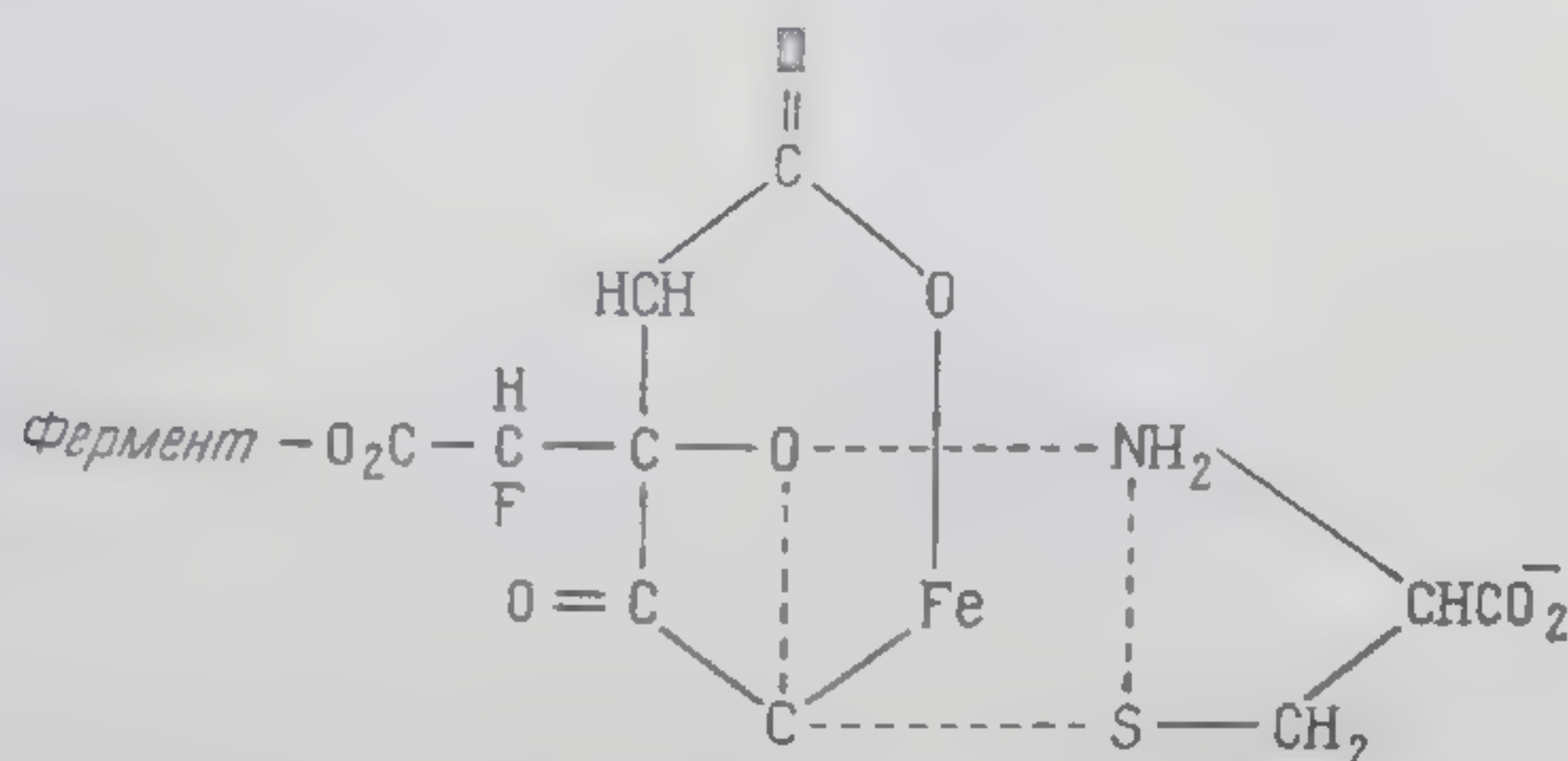


Рис. 3. Схема летального синтеза фторлимонной кислоты.

Фторуксусная кислота с помощью кофермента А вступает в реакцию конденсации со щавелевоуксусной кислотой, и в тканях вместо лимонной кислоты образуется фторлимонная кислота. Синтез фторлимонной кислоты осуществлен Питерсом в тканевых гомогенатах. Было установлено, что данное соединение оказывает резкое ингибирующее действие на протекание цикла соединения, оказывающего резкое ингибирующее действие на протекание цикла трикарбоновых кислот [35, 36]. Из двух ферментов, дегидрогеназы лимонной кислоты и аконитазы, торможение которых теоретически может обусловить накопление лимонной кислоты в тканях, высокой чувствительностью по отношению к фторлимонной кислоте обладала только аконитаза [34, 37, 38]. Известно, что аконитаза активируется цистеином и двухвалентным железом. Предполагается, что при этом образуется достаточно сложный фермент — субстратный комплекс. Введение фтора в состав лимонной

кислоты резко повышает стабильность данного комплекса и делает его недоступным для атаки аконитазы.

Структура предполагаемого комплекса, по Спейеру и Дикману, имеет следующий вид:



Таким образом, цикл доказательств был замкнут. Фторацетат проявляет свою токсичность только после ферментного синтеза фторлимонной кислоты, которая является близким структурным аналогом субстрата и сильным ингибитором аконитазы. Осуществляя этот синтез, организм как бы подготавливает свою гибель, в силу чего биосинтез монофторлимонной кислоты может быть с полным основанием назван летальным синтезом.

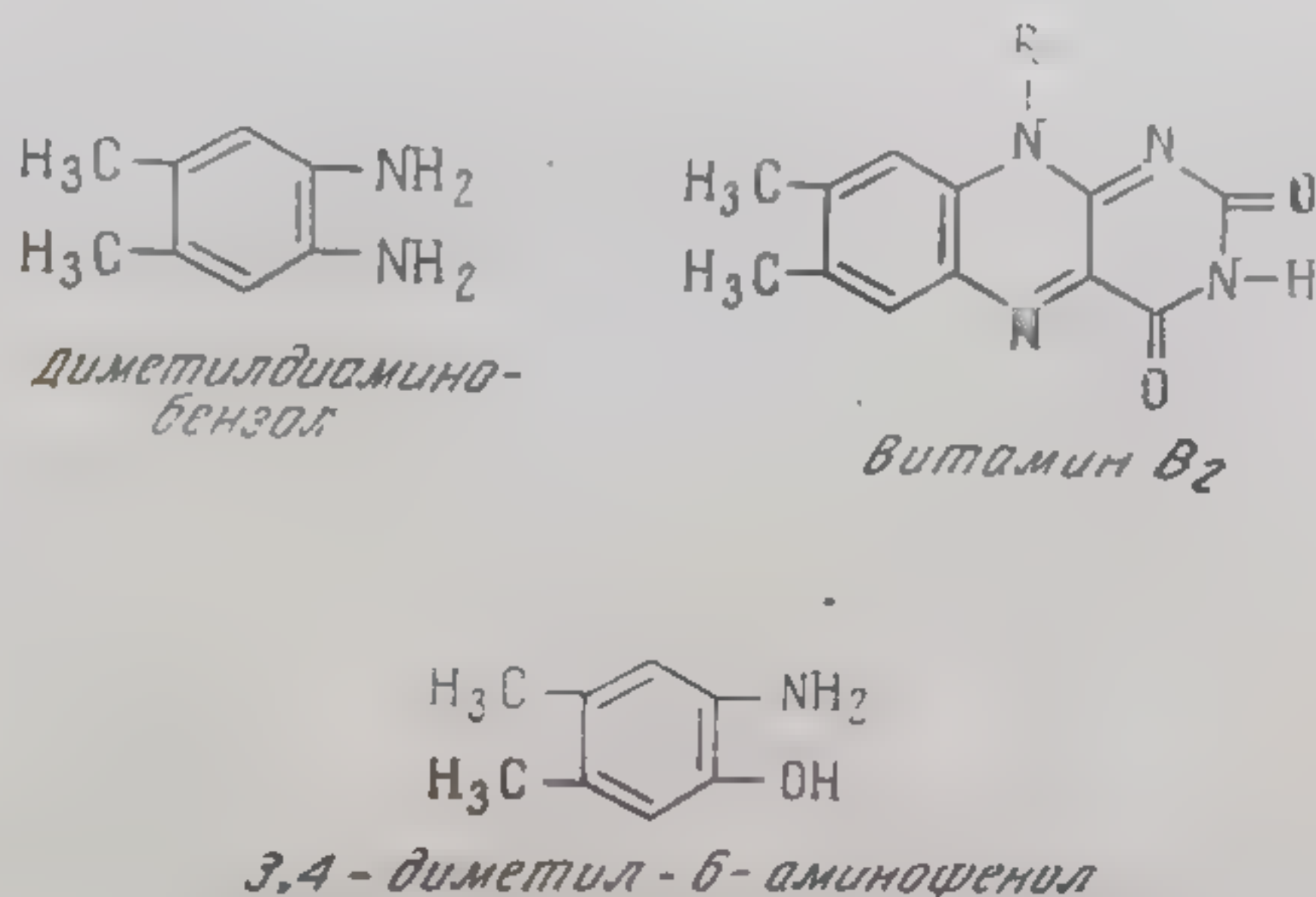
Синтез фторлимонной кислоты не является уникальным примером подобных реакций. Исследования последних лет показывают, что летальный синтез структурных аналогов субстратов — достаточно распространенная реакция. К числу рядов, действующих по данному принципу, следует отнести некоторые фосфорсодержащие инсектициды, например октаметил-тетраамидпирофосфат, который приобретает антихолинэстеразные свойства только после окисления в соответствующий фосфоамидоксид при участии фосфоамидоксидазы [39, 40]. Любопытно, что относительно высокая токсичность метилового спирта связана не с самим алкоголем, а с продуктами его окисления: муравьиной кислотой и формальдегидом. Это окисление катализируется алкогольдегидрогеназой отравленного организма, которая окисляет и обычный этиловый спирт [41]. Показано, что при одновременном присутствии метилового и этилового спиртов их окисление осуществляется по конкурентному типу. Иными словами, существует возможность, вводя в организм значительные количества этилового спирта, замедлить окисление метилового алкоголя и добиться большего процента его выведения из организма в неокисленном практически нетоксическом виде.

К числу ядов, действующих через реакции летального синтеза, относятся этиленгликоль, окисляющийся в щавелевую кислоту [42—44], некоторые галоидазопроизводные пуринов и пиримидинов и многие другие соединения. По-видимому, механизм летального синтеза принимает участие в реализации токсического эффекта ядов чаще, чем принято думать. К такому выводу приводят многочисленные исследования, посвященные поведению ядов в организме, проводимые с помощью структурных аналогов, меченных радиоактивными изотопами.

К третьей группе ферментных ядов должна быть отнесена широкая группа структурных аналогов коферментных группировок и, в частности, анти-витамины. Достаточная литература о механизме биохимического действия этой группы веществ [45—49] позволяет лишь указать на ее большое клиническое значение. Многие из структурных аналогов коферментов могут быть отнесены к разряду эффективных химиотерапевтических препаратов: гидразиды изоникотиновой кислоты, дезоксипиридоксин, пиритиамин, аминоптерин, аналоги диметилдiamiнобензола и т. д. Разумеется, из числа

ядов этой группы могут быть выделены и такие соединения, которые превращаются в структурные аналоги коферментов только после определенных превращений в организме отравленного животного. В частности, дезокси-пиридоксин превращается в ингибитор реакций переаминирования только после предварительного фосфорилирования и превращения в дезоксипиридоксальпирофосфат.

Практическое значение могут иметь аналоги диметилдiamiнобензола, который, как известно, является предшественником в синтезе столь биологически важных соединений, как флавины и витамин В₂. Структурные взаимоотношения между диметилдiamiнобензолом, изоалоксазином и его структурным аналогом, тормозящим биологический синтез как флавинов, так и витамина В₂ 3,4-диметил-6-аминофенолом, отражены в следующих формулах:



К четвертой группе отнесены яды, нарушающие синтез белка вообще и ферментов в частности. В их число входят структурные аналоги природных аминокислот и ряд специфических ингибиторов более сложного строения.

Участвующие в синтезе белка биохимические системы являются многокомпонентными. Носителем первичной информации о типах синтезирующихся в клетке белков считаются дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК). По-видимому, в каждой клетке существует столько различных ДНК, сколько видов молекул белка в ней синтезируется. Однако эта первичная информация вначале передается рибонуклеиновым кислотам (РНК), которые в комплексе со специфическими ферментами образуют многоступенчатые системы, реализующие информацию в виде определенной последовательности соединения отдельных аминокислот посредством пептидных связей.

Доказано, что включению аминокислот (ак) в состав клеточных белков предшествует стадия их активирования путем присоединения к аденилово-предшествует стадия их активирования путем присоединения к аденилово-му компоненту соответствующей ферментной системы. Образующиеся в результате аминокислот-аденилатные комплексы (комплексы Хогланда) передают ак на низкомолекулярную растворимую рибонуклеиновую кислоту — РНК. На следующей стадии, по мнению Гейла [50, 51], ак переносится на гетеротетрапептические факторы включения Х, которые передают ее, наконец, на высокомолекулярную РНК микросом¹. Последняя выполняет роль матрицы при синтезе белка.

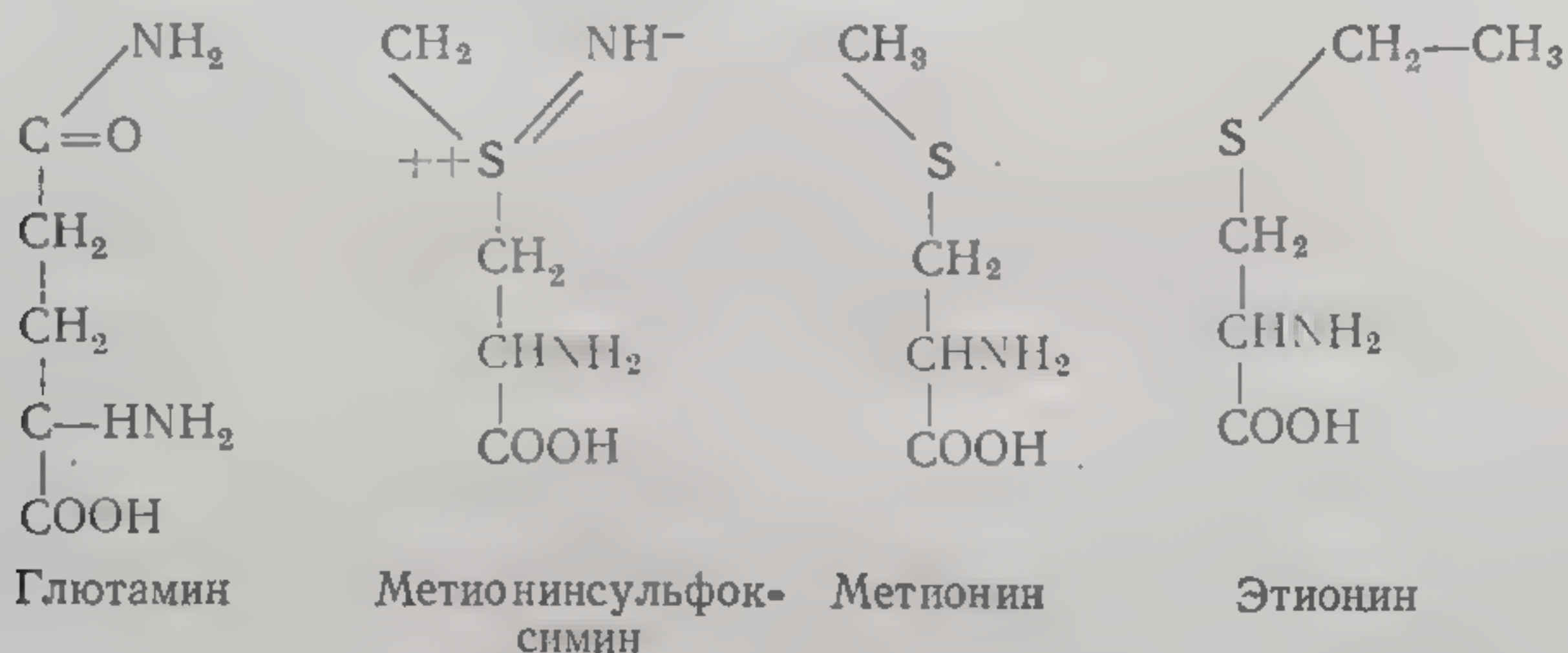
Имеются некоторые наблюдения, дающие основание предполагать, что синтез белка, с одной стороны, и рибонуклеиновых кислот, с другой, яв-

¹ В последнее время представления о передаче информации от ДНК к месту синтеза белка получили интересное развитие при обнаружении так называемой «мессенджер» РНК (см. статью В. С. Тонгур).

ляются двумя сопряженными процессами, имеющими, по-видимому, общих предшественников [52, 53]. Роль последних может быть приписана аминокислотам и подобным им активизированным формам аминокислот.

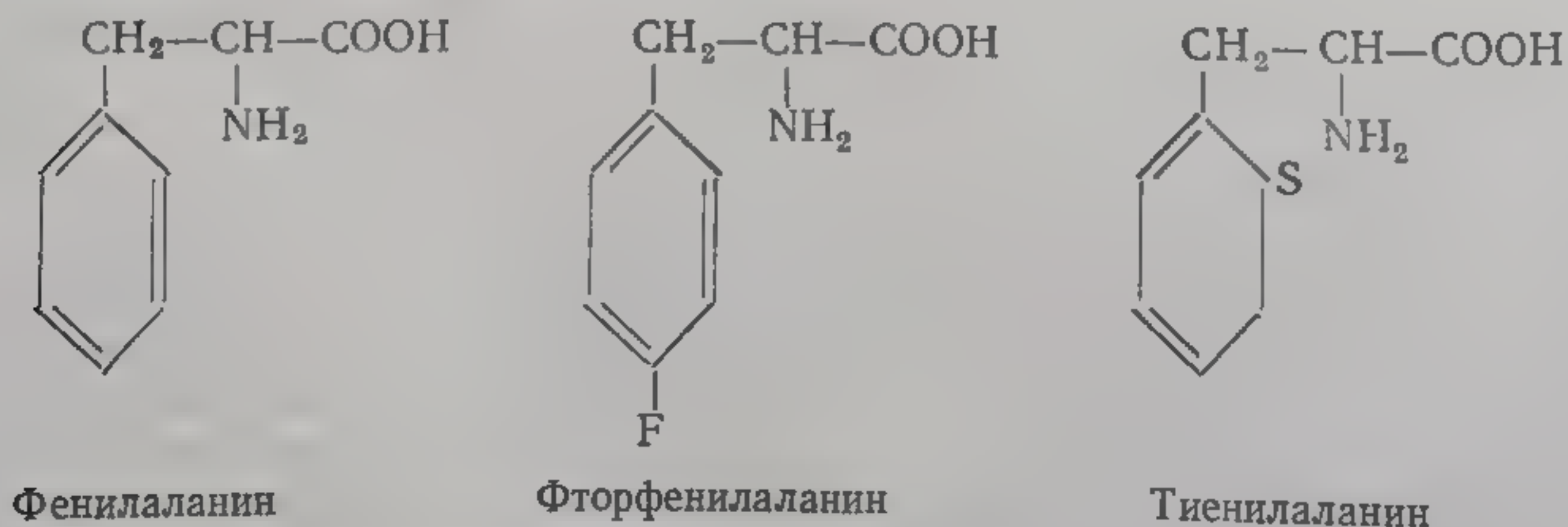
Ингибирующее действие структурных аналогов аминокислот на ферменты, по-видимому, может быть двух видов. Во-первых, структурные аналоги, вступая в конкурентные отношения с природными аминокислотами, могут тормозить синтез специфического белка. В результате значительно уменьшается общее количество ферментов, синтезируемых в организме. Во-вторых, принимая участие в реакциях синтеза, эти соединения могут приводить к появлению аномальных форм — структурных аналогов специфического белка-фермента, лишенных биокаталитической активности.

Механизм токсического действия представителей первого вида удобно продемонстрировать на структурных аналогах метионина. При замещении в молекуле метионина атома серы на кислород образующийся структурный аналог приобретает свойства ингибировать ферментные системы, участвующие в обмене метионина, угнетать рост микробной культуры и вызывать явления интоксикации у мышей [54]. Интересно, что другой структурный аналог метионина — метионинсульфоксимин — приобретает свойства конкурировать в реакциях синтеза глутамина [55, 56], что и понятно при сопоставлении строения названных соединений:



Введение метионинсульфоксимины собакам, по данным Мелленби, является причиной возникновения тяжелых судорог [57, 58].

К токсичным производным аминокислот второго вида следует отнести структурный аналог метионина, в котором метильная группа заменена на этильную — этионин, структурные аналоги фенилаланина — фторфенилаланин, тиенилаланин и др.

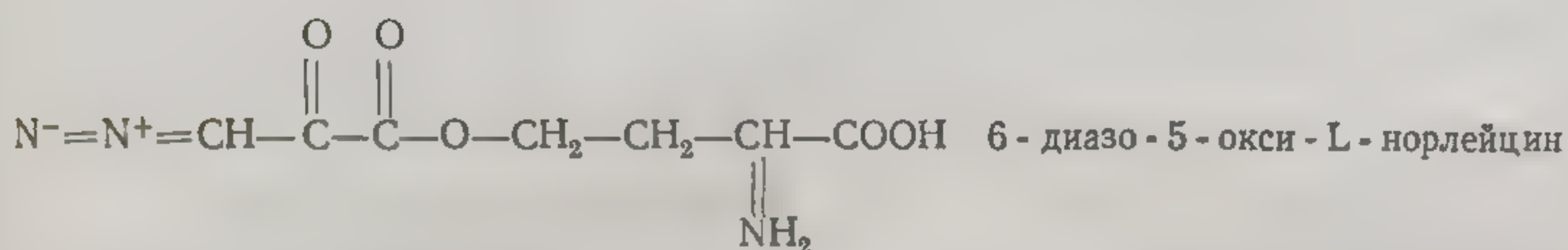
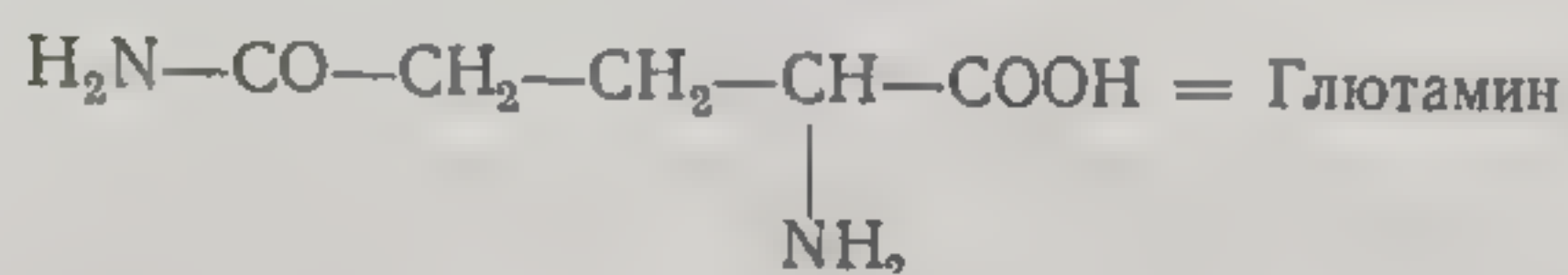
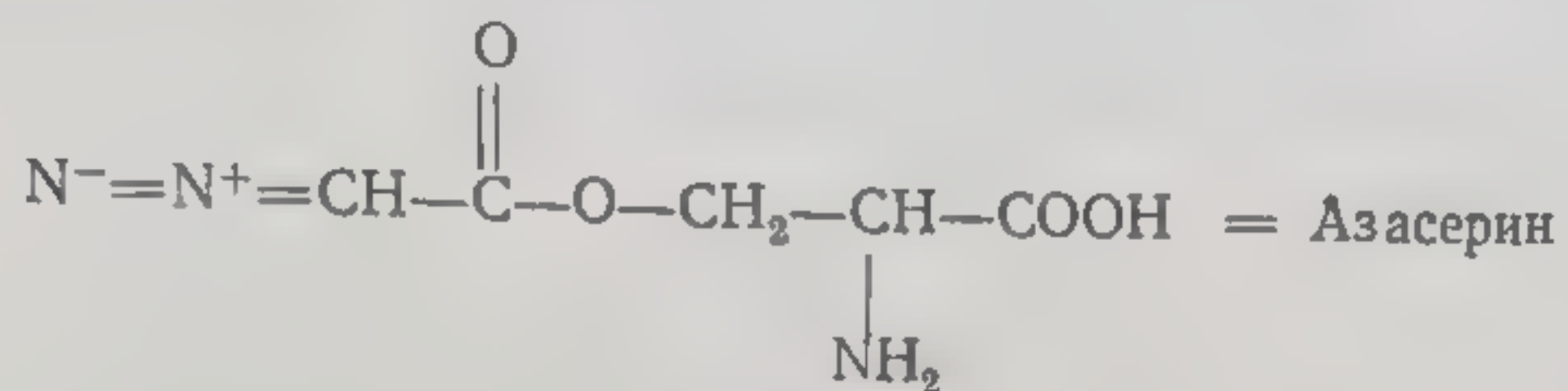


Эти аминокислоты принимают участие в синтетических реакциях и занимают в молекуле синтезирующегося белка места, соответствующие природным аминокислотам. Однако в результате формируются не природные белки, а их структурные аналоги, лишенные ферментных и гормональных свойств [59, 60].

Особый интерес вызывают структурные аналоги аминокислот, синтезируемые микроорганизмами, которые могут выполнять роль антибиотиков. В их числе следует назвать хлорамфеникол или левомецетин, азасерин, а также 6-диазо-5-окси-L-норлейцин. Последние два соединения оказывают сильное тормозящее действие не только на широкий круг микроорганизмов и на развитие куриных эмбрионов, но также некоторых опухолей [61, 62].

Большой интерес вызывает возможность кумулирования токсического эффекта этих соединений.

О механизме токсического действия азасерина и диазооксинорлейцина можно сказать немного. Очевидно, данные соединения являются структурными аналогами не серина, а глутамина, что становится ясным при сопоставлении их структурных формул:



Букенен и сотрудники показали наличие конкурентных отношений между глутамином и азасерином на первых стадиях синтеза пуриновых оснований [63], в частности азокислоты существенно ингибировали следующую реакцию переамидирования:

Формилглицинамид риботид + АТФ + глутамин → формилглицианиамид риботид + АТФ + Ф + глутаминовая кислота.

К специфическим ингибиторам белкового синтеза следует отнести некоторые антибиотики: хлорамфеникол, тетрациклины и т. д. [55, 68]. Хлорамфеникол может рассматриваться как структурный аналог фенилаланина и, следовательно, как конкурентный ингибитор реакций обмена данной аминокислоты.

Вулли действительно обнаружил конкурентные взаимоотношения между хлорамфениколом и фенилаланином при их воздействии на развитие бактериальных культур [69]. Однако главный механизм токсического действия этого антибиотика, как показывают последние работы Парка и сотрудников, более сложен. Хлорамфеникол подавляет процесс включения в клеточные белки не только фенилаланина, но и других аминокислот. Штраубе и сотрудникам удалось обнаружить ингибирующее действие данного антибиотика в отношении синтеза амилазы в клетках панкреатической железы [66]. Таким образом, хлорамфеникол должен рассматриваться в качестве универсального ингибитора синтеза белка. Принимая в качестве рабочей гипотезы представленную выше схему участия нуклеиновых кислот в синтезе белка, Гейл утверждает, что хлорамфеникол ингибирует процесс на стадии переноса аминокислоты от низкомолекулярной РНК к гипотетическому фактору включения X.

В отличие от хлорамфеникола пенициллин не является универсальным ингибитором синтеза белка. Сфера его действия главным образом распространяется на синтез вещества оболочек бактериальных клеток. Парк полагает, что увеличение протяженности оболочек бактериальных клеток в пространстве, являющееся необходимым условием роста бактерий, связано с чередованием процессов расщепления химических связей и включением по месту разрыва новых строительных блоков [64—67].

При воздействии токсических концентраций пенициллина рост клеток затормаживается, оболочки клеток приобретают аномальную «хрупкость» и на их поверхности накапливаются продукты, являющиеся, по мнению Парка, вероятными предшественниками или блоками, из которых должна быть построена оболочка. Парк и Строминтер установили структуру соединений, накапливающихся в районе клеточных оболочек при воздействии пенициллина на культуру золотистого стафилококка. Эти соединения включают в свой состав уридин-5-пирофосфат, N-ацетилмурамовую кислоту и пентапептид (рис. 4).

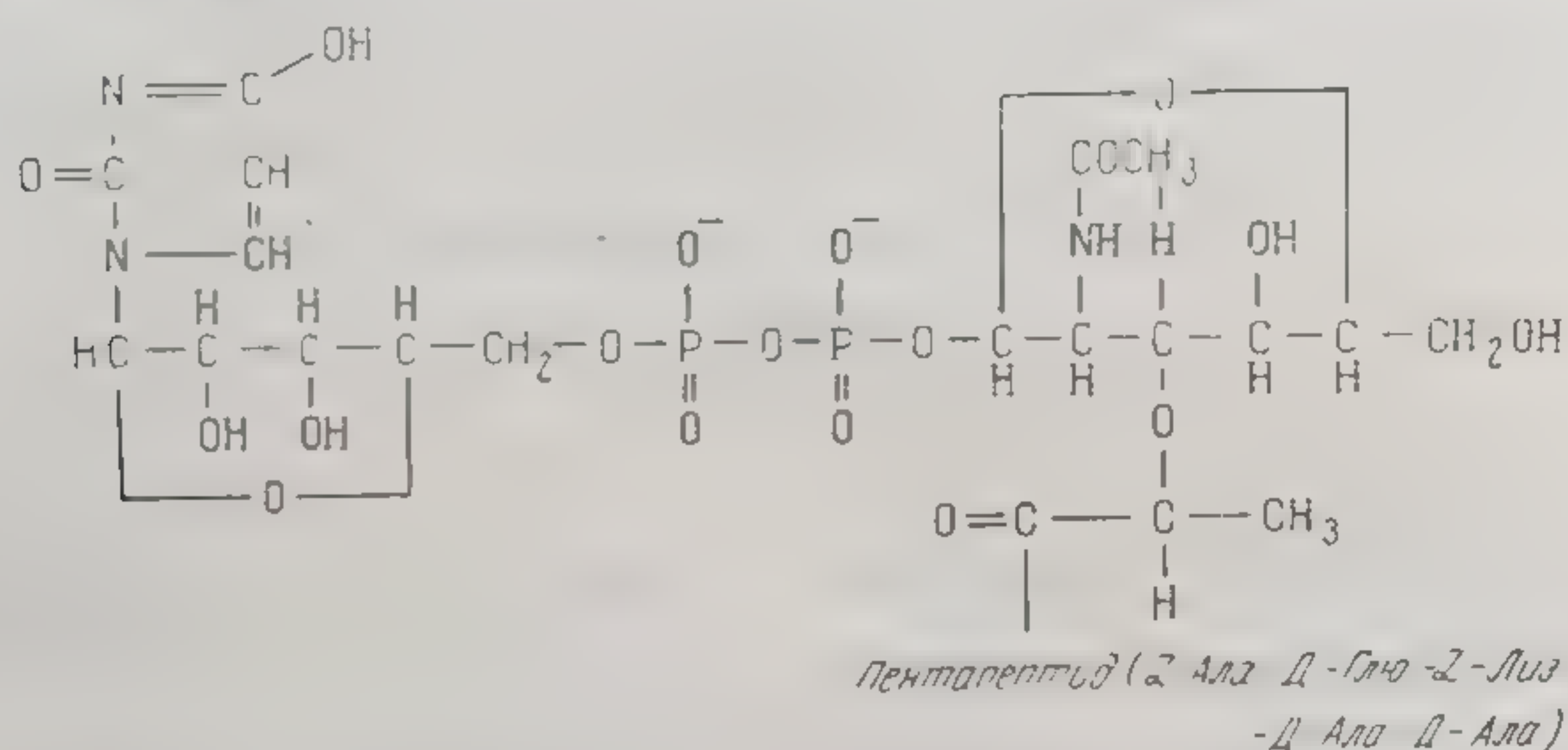


Рис. 4. Уридинпирофосфат- N-ацетилмурамовой пентапептид (соединение Парка —Строминжера).

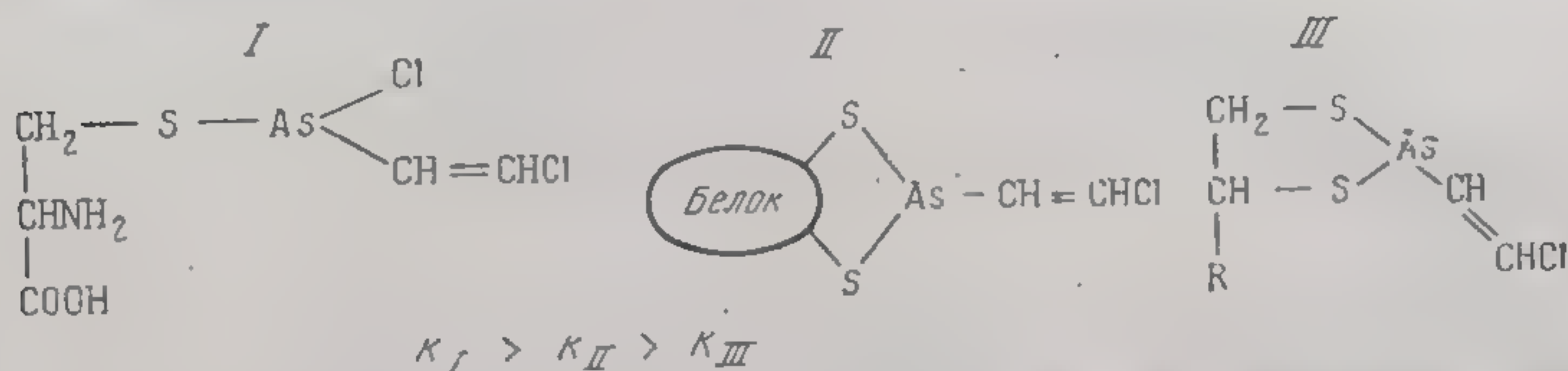
Таким образом, одна из гипотез токсического действия пенициллина сводится к торможению полимеризации строительных блоков вещества клеточных оболочек. Однако соединения Парка можно рассматривать не как «законсервированные» строительные блоки, а как продукты аномального синтеза с отведением урацила от обычного пути включения в состав РНК (Строминжер, Гейл) и нарушения сопряженного с синтезом РНК синтеза белка.

Наконец, обсуждая механизм токсического действия пенициллина, нельзя не упомянуть о представлениях Коэна и Рикенберга [70, 71], которые предположили, что пенициллин в значительной степени угнетает синтез пермеаз, ферментов, локализованных в клеточной оболочке и катализирующих активный перенос строительных веществ, используемых для синтетических процессов клеткой, через ее оболочку. Показано, что при воздействии пенициллина в сильной степени подавляется синтез пермеазы глутаминовой кислоты [50].

К пятой группе ферментных ядов отнесены соединения, не являющиеся структурными аналогами субстратов или коферментных группировок, но в то же время активно реагирующие с отдельными функциональными группами фермента. Между ними и субстратами, как правило, не возникает конкурентных отношений. Эти яды являются более или менее специфичными реактивами на функциональные группы белковой молекулы или просте-

тических групп, способными к осуществлению их относительно избирательного связывания в организме. К указанной группе отнесены многочисленные соединения мышьяка, ртути и других тяжелых металлов, связывающих в организме сульфгидрильные группы и подавляющие в результате активности сульфгидрильных ферментов, соли синильной кислоты, окись углерода, метгемоглобинообразующие соединения, сероводород и другие соединения, блокирующие железосодержащие ферменты, многие алкилирующие соединения, некоторые хелатообразующие агенты и т. п. Выяснение механизма ферментного действия мышьяксодержащих ядов и, в частности люизита, является одним из наиболее ярких примеров высокой продуктивности применения методов биохимического анализа к проблемам молекулярной патологии и терапии. Подчеркнем, что значение широко известных работ Питерса и сотрудников [72—76] отнюдь не сводится только к доказательству глубокого угнетения люизитом ферментной системы окисления пировиноградной кислоты. Более важными следует считать данные прецизионных измерений реакционной способности соединений мышьяка с различными содержащими сульфгидрильные группы веществами, установление значительных различий в свойствах продуктов реакции, позволяющих использовать некоторые из соединений в качестве высокоэффективных антидотов.

В широком ряду сульфгидрильных соединений было показано, что наименьшей устойчивостью обладают меркаптидные связи, возникающие между трехвалентным мышьяком и монотиолами, например, цистеином (формула I). На втором месте по прочности находятся связи, образующиеся между мышьяком и сульфгидрильными группами белковой молекулы (II). Наиболее прочными являются циклические структуры, возникающие при взаимодействии мышьяка с дитиолами (III).



Значительная устойчивость последнего соединения объясняется тем, что оно по структуре относится к группе хелатных комплексов. Очевидно, что образующие их дитиолы могут успешно конкурировать за соединение с трехвалентным мышьяком как с монотиолами, так и с молекулами белка. Указанные данные и легли в основу разработки мощных антидотов против отравлений мышьяком и другими тяжелыми металлами. Было показано, что различные дитиолы и особенно 2,3-димеркаптопропанол (БАЛ) не только конкурируют с сульфгидрильными группами белка за связывание атомов тяжелых металлов в организме, но и способствуют реактивации тиоловых ферментов, блокированных тяжелыми металлами.

К этой же группе ядов могут быть отнесены многочисленные алкилирующие агенты и среди них имеющие большое значение в химиотерапии злокачественных заболеваний аналоги азотных ипритов. Механизм химического взаимодействия последних с функциональными группами белковых молекул благодаря исследованиям школы Бергмана, Хенби, Козна и др. [14, 77—80] представляется достаточно выясненным. При растворении в воде в силу высокой полярности молекулы β -галоидэтильная цепочка скручивается с образованием гипотетического существующего ничтожные промежутки с образованием карбониевого иона, который немедленно переходит в более устойчивые циклические этилениммониевые структуры. Эти этилениммониевые

кольца, равно как этиленимины и эпоксиды, обладают высокой алкилирующей способностью. Алкилирование белка азотными ипритами несомненно связано с предварительной циклизацией этих соединений и последующим взаимодействием этилениммониевых циклов с функциональными, в первую очередь с сульфгидрильными группами белка (рис. 5).

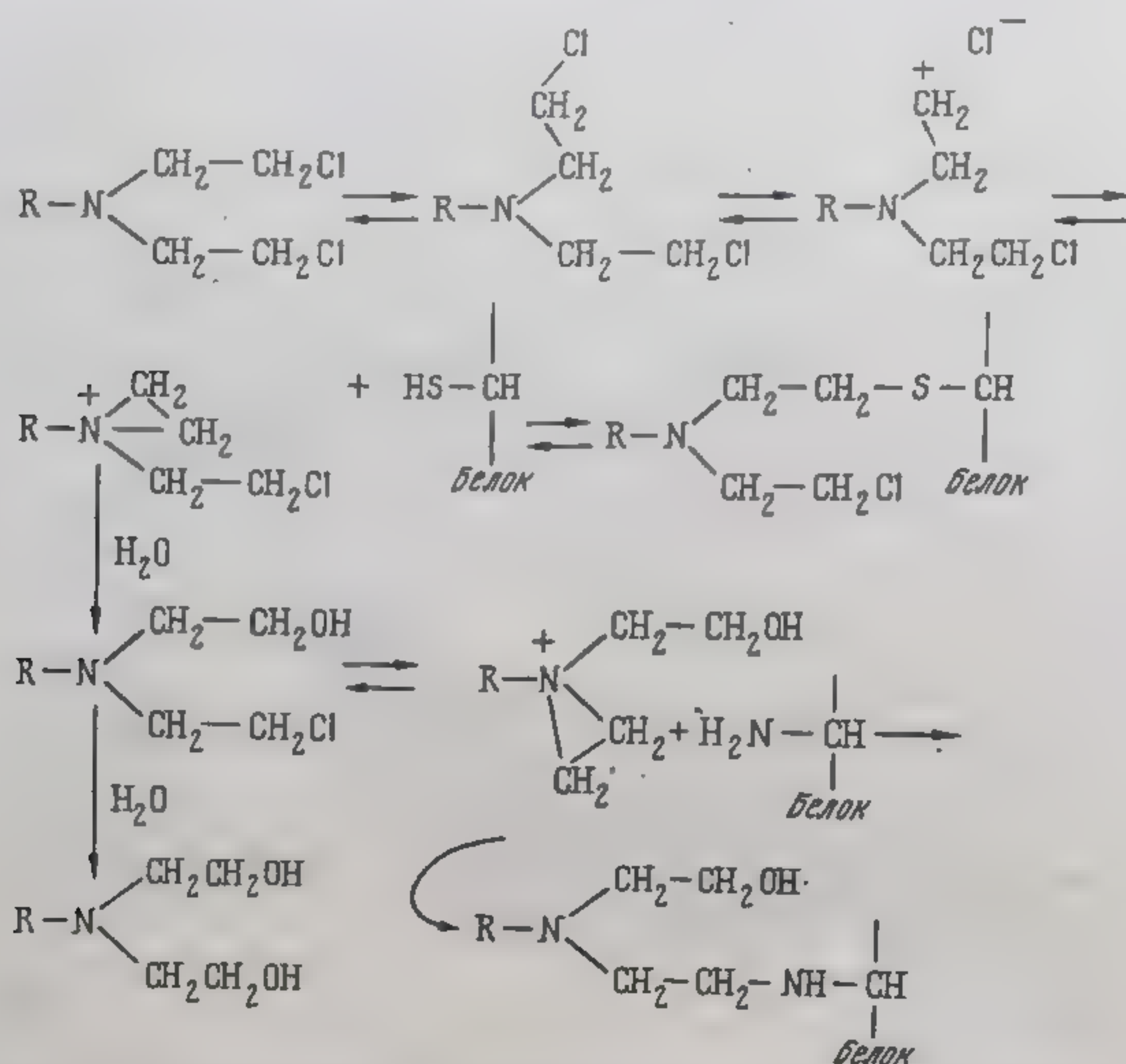


Рис. 5. Алкилирование функциональных групп белка β -галлоидэтиламинами.

Высокий биологический эффект алкилирования азотными ипритами зависит, по-видимому, от образования поперечных перекрестных связей между различными пептидными цепочками белковых молекул, ограничивающих степень свободы флюктуации отдельных частей белковой глобулы. Особенно высокой чувствительностью по отношению к азотным ипритам отличаются ферментные системы, связанные с переносом фосфатных групп от АТФ к гексозам. Обнаружение несомненного радиомиметического действия [81] у группы азотных ипритов привело к направленному синтезу их многочисленных аналогов [82—88]. Продуктивной оказалась идея синтеза гибридных молекул, совмещающих свойства структурных аналогов аминокислот и азотных ипритов. К числу их относятся нашедший практическое применение п-ди (β -хлорэтил) амино-L-фенилаланин или сарколизин (мельфан). Подчеркнем, что L-изомер сарколизина обладает несравненно более высокой активностью, чем D'-изомер.

Шестую группу, тесно примыкающую по механизму действия к некоторым представителям пятой группы, составляют яды, реализующие свое действие через образование хелатных комплексов, с атомами металлов, входящими в состав ферментных систем. После исследований Альберта и его школы [89—92] следует допустить две возможности реализации токсического действия хелатообразующих соединений на ферментные системы: во-первых, прямое блокирование или вырывание из ферментных структур, выполняющих каталитические функции, атомов металлов. Подобный меха-

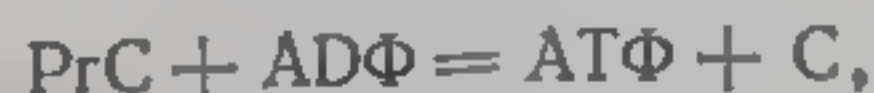
низм, по-видимому, имеет место при взаимодействии ауреомицина с металлофлавопротеидами (связывание марганца в редуктазе), во-вторых, образование из нетоксичных предшественников более реакционноспособных хелатных комплексов. В этих случаях атом металла, по-видимому, образует координационный центр включения молекулы яда в цепь ферментных реакций. Отличительным признаком подобных реакций является феномен концентрации гашения, характеризующийся понижением токсичности яда при повышении его концентрации в системе. Примером подобного механизма может служить действие 8-оксихинолина на культуру стафилококков.

К седьмой группе отнесены яды, нарушающие удивительно четкую организацию взаимодействия отдельных ферментных систем как в микрообъемах клетки, так и во времени. Наиболее ярким примером подобного механизма действия являются яды окислительного фосфорилирования. Динитрофенол, пентахлорфенол, грамицидин, дикумарол и другие яды этой группы разобщают процессы биологического окисления от механизмов аккумуляции энергии в виде макроэргических связей соединений адениловой кислоты, протекающие в митохондриальном аппарате клетки [93—100].

Многочисленные исследования не оставляют сомнений в том, что для осуществления окислительного фосфорилирования необходима определенная пространственная организация ферментных систем, локализованных в митохондриях. Показано, что ферменты биологического окисления распределены более или менее равномерно по протяженности митохондрий [96, 97], а ферменты фосфорилирования сосредоточены преимущественно в их внутренней зоне [98]. Разобщение окислительного фосфорилирования в ряде случаев связано с набуханием митохондрий, что может служить причиной пространственного разъединения ферментов, катализирующих отдельные стадии процесса [99—101].

Кроме того, нарушение структуры митохондрий может быть связано с освобождением и активацией локализованных в них фосфатаз, которые препятствуют накоплению АТФ.

Ленинджер [97] полагает, что сущность влияния динитрофенола сводится к прерыванию цепи реакций переэтерификации, лежащих в основе сопряжения окисления и фосфорилирования.



где А и В — компоненты цепи биологического окисления, а С — гипотетический фактор, осуществляющий реакции переэтерификации. Динитрофенол дефосфорилирует промежуточный продукт РгС и в силу этого прерывает процесс фосфорилирования.

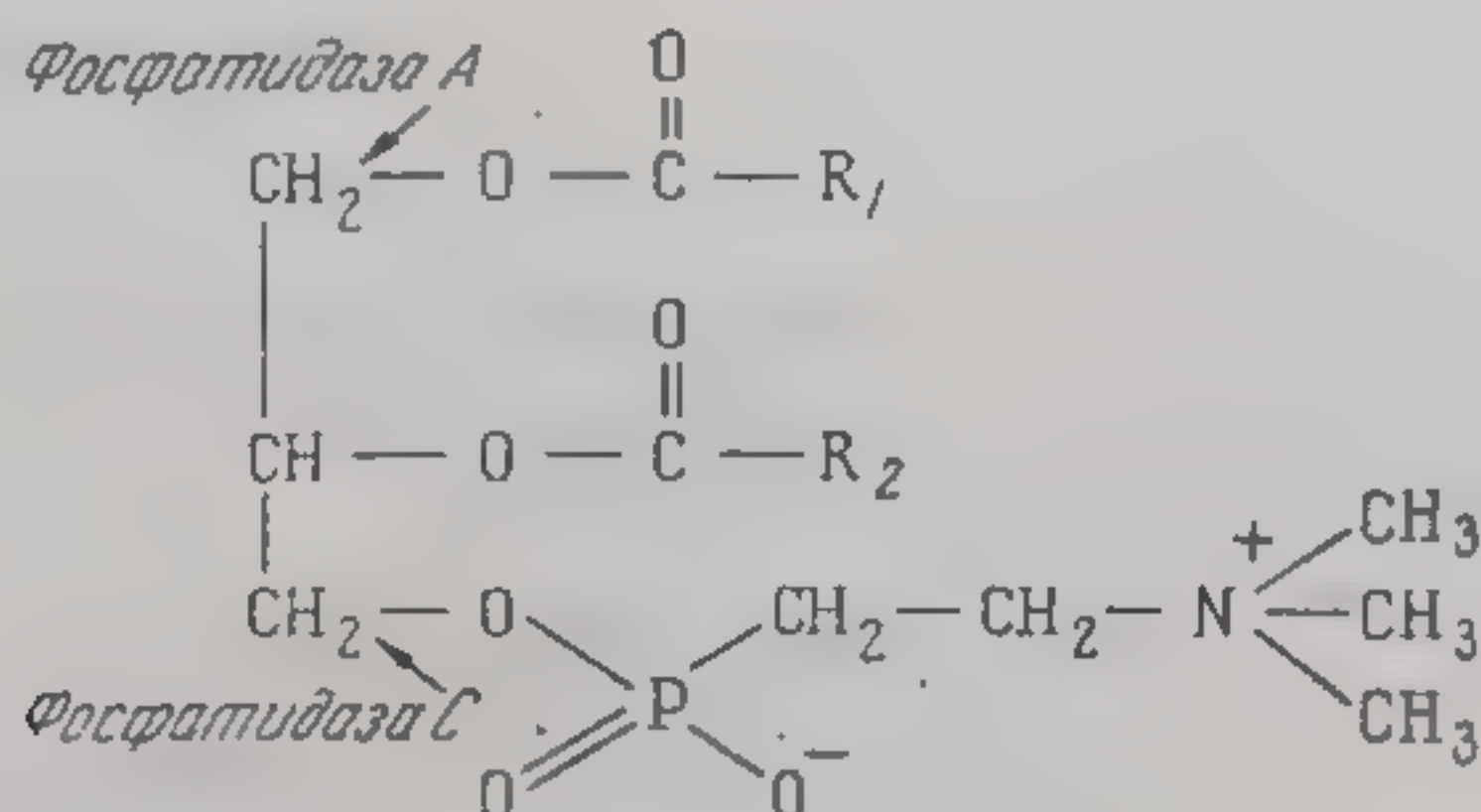
Восьмая группа включает денатурирующие белок агенты. Очевидно, что при денатурации возможны различные степени глубины возникающих нарушений строения белковой молекулы. Относительно мягкие денатурирующие агенты, например растворы мочевины, приводят лишь к некоторым изменениям в третичной структуре белковой глобулы. Нарушение ферментной активности при подобной денатурации может явиться следствием пространственного разобщения функциональных групп белковой молекулы, принимающих участие в формировании активного центра фермента (например, остатков серина и гистидина в эстеразном центре), находящихся на различных участках пептидных цепей. Обычно этот вид денатурации допускает восстановление первоначальной структуры белковой глобулы и связанное с ренатурацией восстановление ферментной активности.

Более жесткие денатурирующие агенты (концентрированные кислоты и щелочи) приводят к грубым и обычно необратимым нарушениям строения белка.

Последнюю, девятую группу составляют яды биологического происхождения, в механизме токсического действия которых важная роль принадлежит ферментным и полиферментным системам, входящим в состав самих ядов. К их числу относятся яды более 150 разновидностей ядовитых змей, значительного числа ядовитых насекомых, а также некоторые токсины бактериального происхождения.

Современные представления о природе токсического действия ядов биологического происхождения достаточно противоречивы и могут служить предметом специального обзора. Сложность исследования этих ядов в значительной степени обусловлена их многокомпонентностью и многообразием проявления биологической активности. Тем не менее практически во всех ядах змей и насекомых обнаружена достаточно сильная активность одного или нескольких ферментов, причем ферментный спектр ядов отдельных биологических видов обнаруживает определенную специфичность и постоянство [102—105].]

Важная роль в механизме токсического действия многих ядов приписывается ферментам, гидролизующим фосфатиды, в частности лецитин. В зависимости от места расщепления эфирных связей их называют фосфатидазами (менее правильно — лецитиназами) А или С. Эти ферменты катализируют расщепление различных фосфатидов: лецитинов, кефалинов и сфингомиелинов. Фосфатидаза А катализирует гидролиз эфирной связи между спиртом и карбоновой кислотой; фосфатидаза С — между спиртом и остатком фосфорной кислоты.



Фосфатидаза А в больших количествах (до 50% общего содержания белка) содержится в ядах гремучих змей (*crotalus terrificus terrificus*) [106]. Этот фермент при попадании в организм млекопитающих проявляет сильное гемолитическое действие, которое активируется лецитином. В механизме гемолитического действия фосфатидазы А (но не фосфатидазы С) значительная роль принадлежит продукту гидролиза лецитина — лизолецитину. Фосфатидаза А была выделена в кристаллическом виде из яда гремучей змеи и получила наименование крототоксина [107, 108]. По-видимому, крототоксин является носителем не только гемолитического, но и нейротоксического действия яда. Последняя точка зрения не разделяется индийскими авторами [102, 109], которым удалось отделить нейротоксический компонент от фракции фосфатидазы.

Значительные количества фосфатидазы С содержатся в токсине *cl. welchii* и ряде других анаэробных клостридий. В отличие от фосфатидазы А этот фермент обладает прямым гемолитическим действием [110, 111]. Отщепление фосфорной кислоты приводит к резкому изменению структурных свойств фосфатидов, в результате чего разрушаются оболочки эритроцитов,

деструктируются липопроотеиды тканей и инактивируется АТФ-аза мышц [111—112].

Таким образом, в механизме токсического действия фосфатаз А и С можно усмотреть принципиальные различия. Одна из них — фосфатаза С — оказывает непосредственное действие на ткани, нарушая их жизненно важные биохимические и гистологические структуры, вторая — фосфатаза А — действует на эритроциты опосредованно через образующиеся в результате гидролиза лецитинов — гемолитические яды — лизолецитины. Нейротоксическое, курареподобное действие яда кобры (паја паја) некоторые авторы склонны связывать с наличием в этом яде фермента холинацетилазы. Примечательно, что данный фермент в ядах других змей не обнаруживается [105, 113]. Однако его роль в механизме реализации токсического эффекта данного яда не может считаться окончательно выясненной.

В состав ядов многих змей входят протеолитические ферменты, которым в реализации токсического эффекта приписывается разнообразная роль [113—117]. Один из возможных механизмов связан с освобождением в тканях отравленного организма гистамина. Вторым механизмом сводится к переводу под влиянием протеолитических ферментов яда протромбина в тромбин и резкому ускорению процесса свертывания крови. Третий, возможный механизм состоит в проявлении цитолитических и геморрагических последствий протеолитической активности яда. Отметим, что протеолитические ферменты несомненно принимают активное участие в реализации токсического действия некоторых бактериальных токсинов. Так, обнаруживающийся в значительных количествах в составе токсина *Cl. histolyticus* — фермент коллагеназа — способствует достаточно энергичному и избирательному разрушению коллагена [118, 119].

Возникновение болевого синдрома, сопровождающего укусы змей и насекомых, большинство авторов рассматривает как сложный ферментный механизм. При исследовании влияния ядов змей на различные ферменты биологического окисления обнаружено, что значительному угнетению подвергается только группа дегидрогеназ [120—122]. Установлен параллелизм между способностью различных разведений яда затормаживать дегидрогеназную активность и вызывать болевой эффект. В связи с этим полагают, что возникновение чувства боли связано с подавлением дегидрогеназ, участвующих в цикле трикарбоновых кислот и накопления в тканях значительных количеств лимонной, щавелевоуксусной и пировиноградной кислот. Чейну удалось установить ферментную природу ингибитора дегидрогеназ. Данный ингибитор оказался пирофосфатазой, расщепляющей дифосфопиридиннуклеотид и тем самым парализующей активность дегидрогеназ. Интересен факт содержания в составе ядов змей и пчел высоких концентраций солей цинка (0,025 М), выполняющих роль ингибитора пирофосфатазы до момента разбавления яда в тканях организма.

Таким образом, яды биологического происхождения достаточно сложные и полиферментные системы, которые при проникновении в организм приводят либо к разрушению жизненно важных соединений и структур (коллагеназа, фосфатаза С, пирофосфатаза и т. п.), либо к освобождению повышенных количеств веществ, обладающих высокой биологической активностью (гистамина, лизолецитина и т. п.).

Изложенные выше принципы ферментной классификации токсических веществ в обобщенном виде представлены в табл. 1.

Мы далеки от мысли считать предпринятую попытку ферментной классификации ядов в какой-то степени завершенной. Однако предлагаемая классификация, несмотря на ее неполноту и незавершенность, все же может способствовать некоторой систематизации накопленных фактов и обоснованию целесообразности использования механизма подавления ферментной

Попытка классификации ядов по механизму их действия на ферменты

№ группы	Механизм действия на ферменты	Отдельные представители
I	Структурные аналоги субстрата, непосредственно взаимодействующие с ферментами. Конкурентное торможение	Малонат, антихолинэстеразные агенты, антисеротонины, циклосерин, галоидпроизводные пиримидинов и др.
II	Предшественники структурных аналогов субстрата, из которых образуются ингибиторы в процессе «летального синтеза». Конкурентное торможение	Фторацетат, некоторые фосфорсодержащие инсектициды, галоидсодержащие производные пиримидинов и пуринов, метиловый спирт и др.
III	Структурные аналоги коферментов, антивитамины. Конкурентное торможение	Гидразиды изоникотиновой кислоты, дезокси- и метокси-пиридоксина, аминоптерин и др.
IV	Соединения, тормозящие биосинтез ферментов. Конкурентное торможение; для некоторых антибиотиков — неконкурентное торможение	Структурные аналоги природных аминокислот: Н — фторфенилаланин, азатриптофан, метионинсульфоксими, этионин. Некоторые антибиотики: пенициллин, левомецетин, ауреомицин, тетрациклин и, вероятно, азасерин и диазооксинорлейцин
V	Соединения, блокирующие функциональные группы белка или кофермента. Неконкурентное торможение	Соединения, связывающие сульфгидрильные группы, цианиды, сероводород, метгемоглобинообразующие агенты, окись углерода и др.
VI	Соединения, нарушающие связи атома и металла в молекуле фермента. Отрыв атома металла от простетических групп, нарушение третичных и четвертичных структур молекул белка	Хелатообразующие соединения: 8-оксихинолин, вероятно, ауреомицин и др.
VII	Соединения, разобщающие в пространстве и времени сочетанную деятельность отдельных ферментных систем	Яды окислительного фосфорилирования: динитрофенол, грамицидин, дикумарол и др. Вероятно, некоторые наркотики
VIII	Денатурирующие белок агенты. Грубое нарушение структуры белковой молекулы	Концентрированные кислоты и щелочи, некоторые органические растворители и др.
IX	Яды биологического происхождения, действующим началом которых являются ферменты. Разрушение функциональных структур клеток и тканей; образование в организме отравленного животного токсигенных веществ	Полиферментные яды змей и насекомых. Некоторые бактериальные токсины: фосфатаза С, коллагеназа и т. п.

активности в качестве одной из ключевых позиций при определении природы токсического начала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Павлов И. П. Полное собрание сочинений. Изд. 2-е, 1951, т. 1, стр. 525, 564, т. 2, стр. 264.
2. Кравков Н. П. Основы фармакологии. Изд. Риккерта, 1908.
3. Гроссман Э. К вопросу состояния ферментативной функции тканей животных при отравлении различными токсинами. Дисс. С.-Петербург, 1912.
4. Грин Д. Биохимия с точки зрения науки об энзимах. В кн.: Успехи современной биохимии. И. Л., 1948.
5. Sumner S., Myrback K. The Enzymes. Acad. Press N. Y., 1950.
6. Нейландс Д., Штумпф П. Очерки по химии ферментов. И. Л., 1958.

7. Nachmansohn D. Chemical and molecular basis of nerve activity. Acad. Press. N. Y., 1959.
8. Burgen A., MacIntosh F. В кн.: Neurochemistry. Изд. Thomas Springfield Ed. JLL, 1955.
9. Jng H. Science, 1949, 109, 264.
10. Jng H., Kordik P., Williams D. Brit. j. Pharmacol., 1952, 7, 103.
11. Wilson J. Biochim. Biophys. acta, 1951, 7, 520.
12. Nachmansohn D., Wilson J. Advanc. in Enzym., 1951, 12, 259.
13. Davies D., Green A. Advanc. in Enzym., 1958, 20, 283.
14. Покровский А. А. Архив патологии, 1959, 7, 13.
15. Koelle G., Gilman A. Pharmacol. Rev., 1949, 1, 166.
16. Покровский А. А. Фармакология и токсикология, 1948, 1, 42.
17. Голиков С., Розенгарт В. Фармакология и токсикология фосфоорганических соединений. Медгиз, 1960.
18. Tammelin L. Acta chem. Scand., 1957, 11, 858.
19. Schaffer N., May S., Summers W. J. Biol. chem., 1953, 202, 67.
20. Oesterbaan R., Jansz H., Cohen J. Biochim. e Biophys. acta, 1956, 20, 404.
21. Wilson J. J. biol. chem., 1951, 190, III.
22. Wilson J., Ginsburg S. Arch. biochem. biophys., 1955, 54, 569.
23. Wilson J. Biochim. biophys. acta, 1955, 18, 168.
24. Wilson J., Ginsburg S. Biochim. pharmacol., 1958, 1, 200.
25. Chids A., Davies D., Green A., Rutland J. Brit. J. pharmac., 1955, 10, 462.
26. Weygand F., Wacker A. Naturforsch., 1952, 76, 19.
27. Heidelberger C., Chandhury N. Nature, 1957, 179, 663.
28. Вышепан Е., Иванова К., Чернух А. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1959, 47, 52.
29. Азарх Р., Браунштейн А., Пасхина Т., Сюй Тин Сень. Биохимия, 1960, 25, 954.
30. Сюй Тин Сень. Выделение и свойства трансаминазы глутамина. Дисс. АМН, 1961.
31. Chenoweth M. Pharmacol Rev., 1959, 1, 388.
32. Liebecq C., Peters R. Biochim. e biophys. acta, 1949, 3, 215.
33. Buffa P., Peters R. J. physiol., 1949, 110, 488.
34. Peters R. Advanc. in enzym., 1957, 18, 113.
35. Peters R., Wakelin R., Rivett D., Thomas L. Nature, 1953, 171, 1111.
36. Peters R., Wakelin R., Buffa P., Thomas L. Proc. Roy Soc., 1953, 140, 497.
37. Morrison J. Biochem J., 1954, 56, 99.
38. Spreyer J., Dickman J. J. biolog. chem., 1956, 220, 193.
39. Casida J., Allen T., Stahmann M. J. biol. chem., 1954, 210, 607.
40. Casida J., Charnan R. J. econom. entomolog., 1954, 47, 64.
41. Маркхем Р. Летальный синтез. В кн.: Стратегия химиотерапии. II. Л., 1960.
42. Morris H., Nelson A., Calvary U. J. pharmacol exp. therap., 1942, 74, 266.
43. Фридлиб Б. Этиленгликоль. Дисс., 1948.
44. Розенберг П. К токсикологии этиленгликоля (антифриза) и диоксана. Институт гигиены труда и профзаболеваний. Дисс., 1952.
45. Вулл Д. Учение об антиметаболитах. II. Л., 1951.
46. Труфанов А. Биохимия и физиология витаминов и антивитаминов. Сельхозгиз, 1959.
47. Збарский В., Иванов Н., Мардашев С. Биологическая химия, 1960.
48. Vasc. Z., Cheymol J. Pharmacodinamie biochimique. Masson. Paris, 1954.
49. Вулл Д. Создание антиметаболитов. В кн.: Стратегия химиотерапии. II. Л., 1960.
50. Гейл Э. Специфические ингибиторы синтеза белка. В кн.: Стратегия химиотерапии. II. Л., 1960.
51. Gale E., Folkes J. Biochem. J., 1953, 53, 483.
52. Hoagland M. Biochim. biophys. acta, 1955, 16, 288.
53. Ycas M., Brawermann G. Arch. biochem. biophys., 1957, 68, 118.
54. Travers J., Cerecedo L. Proc. soc. exper. biol. a. med., 1951, 76, 487.
55. Waelsch H., Owades K., Miller K., Boreck E. J. biol. chem., 1946, 160, 273.
56. Elliot W. Biochem. j., 1951, 49, 106.
57. Campbell P., Work T., Mellanby E. Biochem. j., 1951, 48, 106.
58. Mellanby E. Brit. med. j., 1946, 885.

59. Gross D., Teller H. J. *biol. chem.*, 1955, 217, 169.
60. Swanseid M., Swanson A., Bethell F. J. *biol. chem.*, 1953, 201, 803.
61. Reilly C. *Bact. proc.*, 1954, 79.
62. Reilly C. В сб.: *Aminoacids a. peptides with antimetabolic activity*. London Churchill, 1958.
63. Buchman J. В сб.: *Aminoacids a. peptides with antimetabolic activity*, Churchill, 1958.
64. Парк Д. Избирательное торможение синтеза оболочки бактериальной клетки и возможность использования этого явления в химиотерапии. В кн.: *Стратегия химиотерапии*. И. Л., 1960.
65. Park J., Strominger J. *Science*, 1957, 125, 99.
66. Park J. J. *biol. chem.*, 1952, 194, 877.
67. Park J. *Fed. proc.*, 1954, 13, 271.
68. Straub F., Ullman A. *Bioch. biophys. acta*, 1957, 23, 665.
69. Woolley D. J. *biol. chem.*, 1956, 185, 293.
70. Cohen G., Reckenberg H. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 91, 693.
71. Work E. *Nature*, 1957, 179, 841.
72. Peters R., Stocken L., Thompson P. *Nature*, 1945, 156, 616.
73. Peters R., Sinclair H., Thompson R. *Biochem. j.*, 1946, 40, 516.
74. Stocken L., Thompson R. *Biochem. j.*, 1946, 40, 529.
75. Stocken L., Thompson R., Whittaker V. *Biochem. j.*, 1947, 41, 47.
76. Stocken L. *Biochem. j.*, 1947, 41, 358.
77. Bergman M., Fruton J., Golumbic C., Stein W., Stahman M. Серия статей: «Chemical reaction the nitrogen mustard gases», *J. organic chem.*, 1946, 11, 5.
78. Gilman A., Phillips F. *Science*, 1946, 103, 409.
79. Hamby W., Hartley G., Powell E., Rydon H. J. *chem. soc.*, 1947, 519.
80. Cohen B., Van Artsdalen E. J. *amer. chem. Soc.*, 1948, 70, 281.
81. Boyland E. *Biochem Soc. symposia*, 1948, 2, 61.
82. Phillips F. J. *Pharmacol. exp. therap.*, 1950, 99, 281.
83. Росс У. Химия цитотоксических алкилирующих средств. В кн. *Успехи в изучении рака*. Т. I. И. Л., 1955.
84. Stock J. Aminoacid a. peptide derivatives with potential antitumour property. В сб.: *Sympos. aminoacids. a. peptides with antimetabolic activity*. London, Churchill, 1958.
85. Bergel F., Stock J. J. *Chem. Soc.*, 1954, 2409.
86. Bergel F., Burn V., Stock J. J. *Chem. Soc.*, 1955, 1223.
87. Ларионов Л. 2-я конференция по химиотерапии неопластических заболеваний. АМН СССР, 1953.
88. Блохин Н., Переводчикова Н. *Father clinical. observations on p-Di (Z-chloroethyl) amino-DZ-phenylalanine (sarcolysine) in comparison with some other chloroethylamine derivatives*. В сб.: *Sympos aminoacids a. peptides with antimetabol. activity*. London. Churchill. 1958.
89. Альберт Э. Избирательная токсичность И. Л., 1954.
90. Albert A., Gibson M., Rubbo S. *Brit. j. exper. Path.*, 1953, 34, 119.
91. Albert A., Rubbo S., Goldacre R., Balfour B. *Brit j. exper. path.*, 1947, 28, 69.
92. Альберт Э. Металлосвязывающие агенты в химиотерапии. В сб. *Стратегия химиотерапии*. И. Л., 1960.
93. Ларди Г. Дыхательные ферменты. И. Л., 1952.
94. Хесин Р. Биохимия цитоплазмы. Изд. АН СССР, 1960, 19.
95. Скулачев В. *Успехи современной биологии*, 1958, 46, 241.
96. Gamble J., Lehninger A. J. *biol. chem.*, 1956, 223, 921.
97. Cooper C., Lehninger A. J. *biol. chem.*, 1957, 224, 547.
98. Siekevitz P., Potter V. J. *biol. chem.*, 1955, 215, 221.
99. Скулачев В., Маслов С. *Биохимия*, 1960, 25, 1055.
100. Северин С., Ян Фу Юй. *Биохимия*, 1960, 25, 855.
101. Remmert L., Lehninger A. *Proc. nat. acad. sci.*, 1959, 45, 1.
102. Ghash B., Jarkar N. В кн.: *Venoms*. Washington—Berkley, 1956.
103. Neumann W., Haberman E. B. В кн.: *Venoms*. Washington—Berkley, 1956.
104. Yensen H., Westphal U. В кн.: *Venoms*. Washington—Berkley, 1956.
105. Zeller E. В кн.: *The Enzymes v. I* под ред. Sumner Myrback. N. Y. Acad. Press., 1951.
106. Fraenkel-Conrat H., Fraenkel-Conrat J. *Biochem. biophys. acta*, 1950, 98.
107. Slotta K., Fraenkel-Conrat H. *Ber.*, 1938, 71, 1076.
108. Galen N., Svedberg T. *Biochem. j.*, 1938, 32, 1375.
109. Ghosh B. *Nature*, 1938, 143, 380.

110. McFarlan M. Biochem j., 1950, 47, 270.
111. Van Heyningen W. Biochem j., 1941, 35, 1246.
112. Kieley W., Meyerhof O. J. Biol. chem., 1950, 183, 391.
113. Jengar N., Schra K. a. oth. Current sci., 1938, 7, 51.
114. Raosh Sh., Rap S. В кн.: Venoms Washington—Berkley, 1956.
115. Eagle H. J. exp. med., 1937, 65, 613.
116. Eagle H., Harris T. J. gen. Physiol., 1937, 20, 543.
117. Ван Хайнинген В. В кн.: Белки, под ред. Нейрат, Бейли, И. Л. 1952, т. 3, ч. 1.
118. MacFarlane R., MacLennan J. Lancet, 1945, 2, 328.
119. Bidwell E., van Heyningen W. Biochem j., 1948, 42, 140.
120. Chain E. Biochem j., 1939, 33, 407.
121. Tleckenstein A., Toppel H., Kroner H. Arch. exp. path. pharmacol., 1950, 210, 380.
122. Tleckenstein A., Fettig B. Z. Naturforsch., 1951, 6b, 213.
123. Покровский А. А. Биохимия, 1959, 21, 683.
124. Покровский А. А. Вопр. мед. хим., 1958, 4, 292.

3. МИКРОЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕРМЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ (ТЕХНИКА ПРОВЕДЕНИЯ)

А. А. Покровский

Развитие функциональной и клинической биохимии, равно как и многочисленных сопряженных с ними отраслей биологии и медицины, настоятельно требует разработки и дальнейшего совершенствования микрометодов определения активности различных ферментов. Действительно, часто биолог может использовать для анализа лишь немногие миллиграммы, а иногда и немногие микрограммы материала. Необходимость исследования ряда ферментов в очень незначительных количествах материала возникает при проведении работ в области сравнительной биохимии, эмбриохимии, физиологии насекомых, изучения биохимических основ изменчивости у микроорганизмов, многочисленных вопросов функциональной биохимии, серийных исследований крови с диагностическими целями, особенно в педиатрических клиниках, и т. п.

Подчеркиваем, что в плазме крови человека удается обнаружить свыше 50 ферментов. Для каждого из них могут быть установлены границы колебаний в норме и при различных заболеваниях. Соотношение активности этих ферментов позволяет определить ферментную формулу, или так называемый ферментный спектр крови [1], диагностическая ценность которого значительно выше, чем отдельных ферментных тестов.

Если же обратиться к методам определения ферментной активности, получившим распространение в практике работы рутинных клинических и многих экспериментальных лабораторий, и сопоставить их с современной классификацией химического анализа, то нетрудно убедиться в том, что большинство используемых методов относится к классу полумикро- или саитиграммового анализа [2—4], требующих для своего осуществления крови из вены. Между тем при многих заболеваниях ценные в диагностическом и прогностическом отношении данные удается получить только при многократных исследованиях ферментной активности крови и лишь в том случае, когда они проводятся с первого дня заболевания (исследование трансаминаз, холинэстеразы и альдолазы при инфарктах миокарда; амилазы и липазы при острых панкреатитах и т. п.).

Причины явно недостаточного использования микрометодов в клинической медицине следует искать, по-видимому, в их относительной сложности

и малой приспособленности к практическим задачам, возникающим перед врачом и биологом. Важнейшими требованиями к методам клинической биохимии должны служить: удовлетворительная точность, их доступность и простота, а также значительная скорость осуществления, допускающая проведение серийных анализов. По нашему глубокому убеждению, в практике работы лабораторий далеко не всегда правильно оценивается значение фактора времени в сообщении результатов анализа врачу. Динамичность развития патологического процесса, непрерывно вносящая изменения в исследуемые биохимические показатели, часто заставляет считать поступающие на следующий день к врачу данные ретроспективными. Очевидно, скорость выполнения лабораторных исследований должна быть значительно повышена. Методы лабораторного анализа только тогда приобретут полное значение, когда они смогут буквально сопровождать клинические наблюдения и действия лечащего врача. Техника важнейших биохимических исследований должна быть настолько простой и доступной, чтобы при необходимости сам врач в течение немногих минут мог бы получить хотя бы качественный или полуколичественный, но достоверный ответ, достаточный для подтверждения или отрицания предполагаемого диагноза. Подобные экспресс-методы биохимического анализа, разумеется, в сочетании с более точными и даже прецизионными приемами могли бы существенно расширить возможности применения вспомогательных лабораторных методов диагностики непосредственно у постели больного.

Возникает задача дальнейшего совершенствования и систематизации существующих биохимических методов вообще и определения ферментной активности применительно к задачам, стоящим перед рядовыми больничными лабораториями в частности. В литературе описано большое количество методов определения ферментной активности, предназначенных для клинических целей. Среди них имеются как прецизионные, основанные на применении достаточно дефицитных и дорогостоящих приборов (спектрофотометров, полярографов, различного рода автоматических устройств и т. п.), так и весьма простые, дающие полуколичественный ответ, связанные с применением индикаторной бумаги, таблетированных реактивов и т. п. Последняя группа методов, нашедшая широкое распространение за рубежом, несмотря на низкую точность, обладает все же определенными достоинствами, главными из которых являются простота и скорость осуществления анализа. Применение подобных упрощенных методов несомненно оправдано и может найти более широкое распространение в практике нашего здравоохранения в сочетании в случае необходимости с последующим применением более точных исследований. Таким образом, в проведении биохимических исследований в клинике оправданной является определенная система применения аналитических приемов, предусматривающая известную последовательность или тактику использования современных методических возможностей. В широкой сети поликлиник, консультаций, сельских больниц было бы желательно иметь наиболее простые, экспрессные методы определения ферментной активности, не требующие для своего производства сложной аппаратуры, являющиеся по сути дела биохимическими диагностическими тестами, дающими возможность быстрой ориентировки врача. На последующих этапах точность методических приемов, равно как и техническая оснащенность лабораторий, должна увеличиваться.

Предложенный в 1920 г. и в дальнейшем детально разработанный Н. А. Тананаевым капельный метод анализа, нашедший широкое распространение в технике [5—7], поразительно медленно проникает в сферу медицинской химии и биологии. Между тем этот метод обладает рядом неоспоримых достоинств: он прост в осуществлении, отличается высокой чувствительностью, требует небольших количеств исследуемого материала, обеспечивает

серийное проведение и высокую скорость осуществления анализов, весьма экономичен и не связан с использованием сложного дорогостоящего оборудования. Основным препятствием на пути его широкого внедрения в практику является преимущественно качественный характер оценки получаемых результатов.

Мы задались целью, во-первых, попытаться разработать технические приемы капельного анализа, пригодные для ориентировочной количественной оценки результатов ряда биохимических и, в частности, ферментных реакций, и, во-вторых, предложить возможно более простые, но достаточно точные, пригодные для клинической практики экспресс-микрометоды определения ферментной активности. Осуществление этой задачи потребовало разработки некоторых оригинальных приборов и технических приемов биохимического микроанализа, описанию которых и посвящается настоящее сообщение.

Разработанная техника микроанализа предусматривает применение как при наиболее простых, ориентировочных, так и при достаточно точных аналитических приемах одних и тех же многогнездных пластмассовых реакторов. При проведении капельных реакций с визуальной колориметрической или нефелометрической оценкой эти реакторы служат одновременно компараторами, позволяющими осуществлять сравнительную оценку скорости изменения цветовых оттенков, а равным образом и интенсивности окраски (мутности) исследуемых растворов. Эти же реакторы используются в целях термостатирования реакционных смесей при определении ферментной активности в изотермических условиях. Близкие по форме реакторы применены при определениях активности ферментов, требующих на конечной стадии проведения микродиффузии газообразных продуктов реакции и последующего микротитрования.

Таким образом, многогнездные пластмассовые реакторы служат одним из основных элементов предлагаемой техники микроанализа, создающим преемственность между этапами предварительного ориентировочного и последующего более точного исследования материала.

КОМПАРАТОРЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ И ВИЗУАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ РЕЗУЛЬТАТОВ КАПЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

Для ориентировочной количественной оценки результатов колориметрических и нефелометрических определений в сравнительных опытах была изучена возможность проведения капельных реакций на фильтровальной бумаге, стеклянных и фарфоровых пластинках, а также в разработанных бумаге, стеклянных и фарфоровых пластинках, а также в разработанных пластмассовых компараторах. Последние позволяли добиваться большей точности колориметрических и нефелометрических измерений. Основной деталью компараторов является пластинка толщиной 10 — 12 мм с высверленными в ней цилиндрическими гнездами одинаковой глубины и диаметра. Дно гнезд образует ровную поверхность, параллельную нижней плоскости пластинки. Для большинства исследований используются гнезда диаметром 5 мм и глубиной 8 мм, вмещающие около 0,15 мл. Для специальных целей объем гнезд может быть уменьшен или увеличен. Гнезда располагаются на равном расстоянии друг от друга в 3—6 рядов (рис. 1). Наружная поверхность пластинки и внутренняя поверхность гнезд шлифуются пастой ГОИ. Испытаны многогнездные пластинки из различных пластмасс: метакрилат-ного органического стекла, полиэтилена, полистирола, фторопласта-4 и др. Для большинства биохимических исследований лучшие результаты получены с пластинами из прозрачного метакрилатного стекла. Точности колориметрических и нефелометрических сравнений способствуют как оптическая прозрачность органического стекла, так и хорошо воспроизводимая

цилиндрическая форма отдельных гнезд, позволяющая рассматривать исследуемые жидкости при равной толщине слоев. Химическая стойкость и индифферентность этого материала в общем отвечают мягким условиям проведения большинства ферментных реакций. Возможности колориметрических сравнений при использовании подобных реакторов значительно выше, чем при изготовлении компараторов из других пластмасс или тем более при проведении реакций на бумаге, стеклянных пластинках и т. п. Пластины из органического стекла прочны и удобны в пользовании. Однако они непригодны для работы с некоторыми органическими растворителями (дихлорэтан, хлороформ, толуол и т. п.), а также быстро портятся при работе с концентрированными кислотами и щелочами. Последнего недостатка ли-

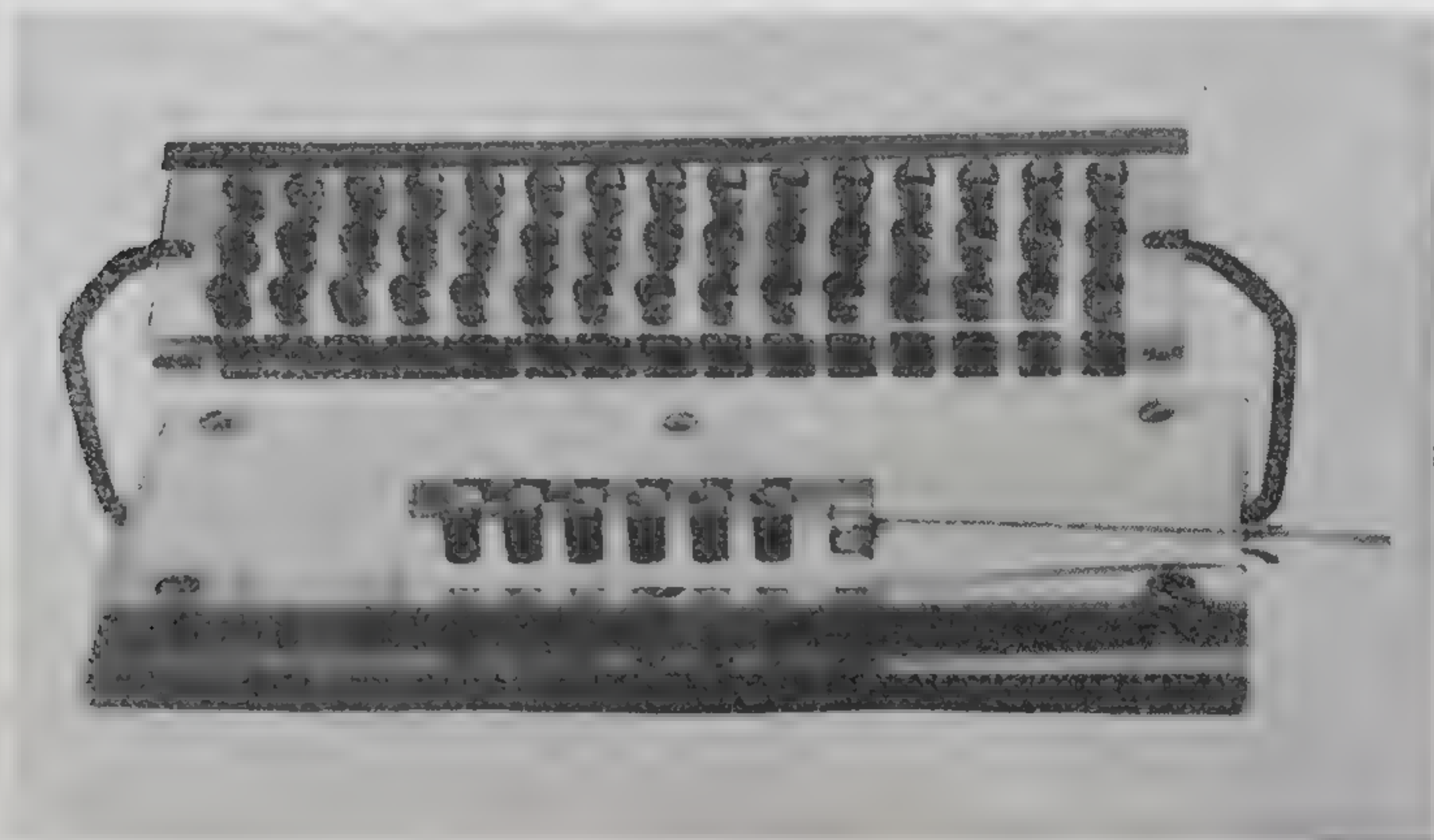


Рис. 1. Расположение гнезд в пластмассовом компараторе.

шены пластинки из фторопласта-4 и разработанные нами пластины из менее дефицитных пластмасс с химически устойчивыми вкладышами (например, стеклянными).

Второй важной деталью компараторов является штатив со сменными белым и черным экранами. Пластина компаратора соединена с основанием стальной пружинящей дужкой, позволяющей смещать взаимное расположение пластинки и экрана под углом, добиваясь наиболее выгодного освещения фона. В представленном на рис. 2 компараторе основание выполнено из пластинок молочно-белого органического стекла (белый экран) и черного эбонита (темный экран), скрепленных между собой винтами. Смена черного экрана на белый достигается поворотом основания на 180° вокруг нижней оси дужки (см. рис. 2). Многогнездная пластинка компаратора укрепляется на штативе благодаря вхождению утолщенных концов пружинящей дужки в боковые углубления пластинки. Конструкция предусматривает возможность смены пластинок, различающихся как по размеру гнезд, так и по материалу, из которого они изготовлены. Изготовление описанных компараторов ввиду простоты конструкции представляет относительно несложную задачу. Наиболее ответственной операцией является высверливание гнезд равного диаметра и глубины, что достигается за счет ограничителей, надеваемых на сверло. Техника работы с описанными компараторами не сложна. Она сводится к смешению в отдельных гнездах предусмотренных методикой количеств компонентов реакционной смеси и проведению визуаль-

ных сравнений с колориметрическими (нефелометрическими) стандартами, располагаемыми в лежащих вблизи гнездах. Для большинства разработанных ферментных тестов предусматривается регистрация времени уравнивания цвета или интенсивности окраски в исследуемой пробе с колориметри-

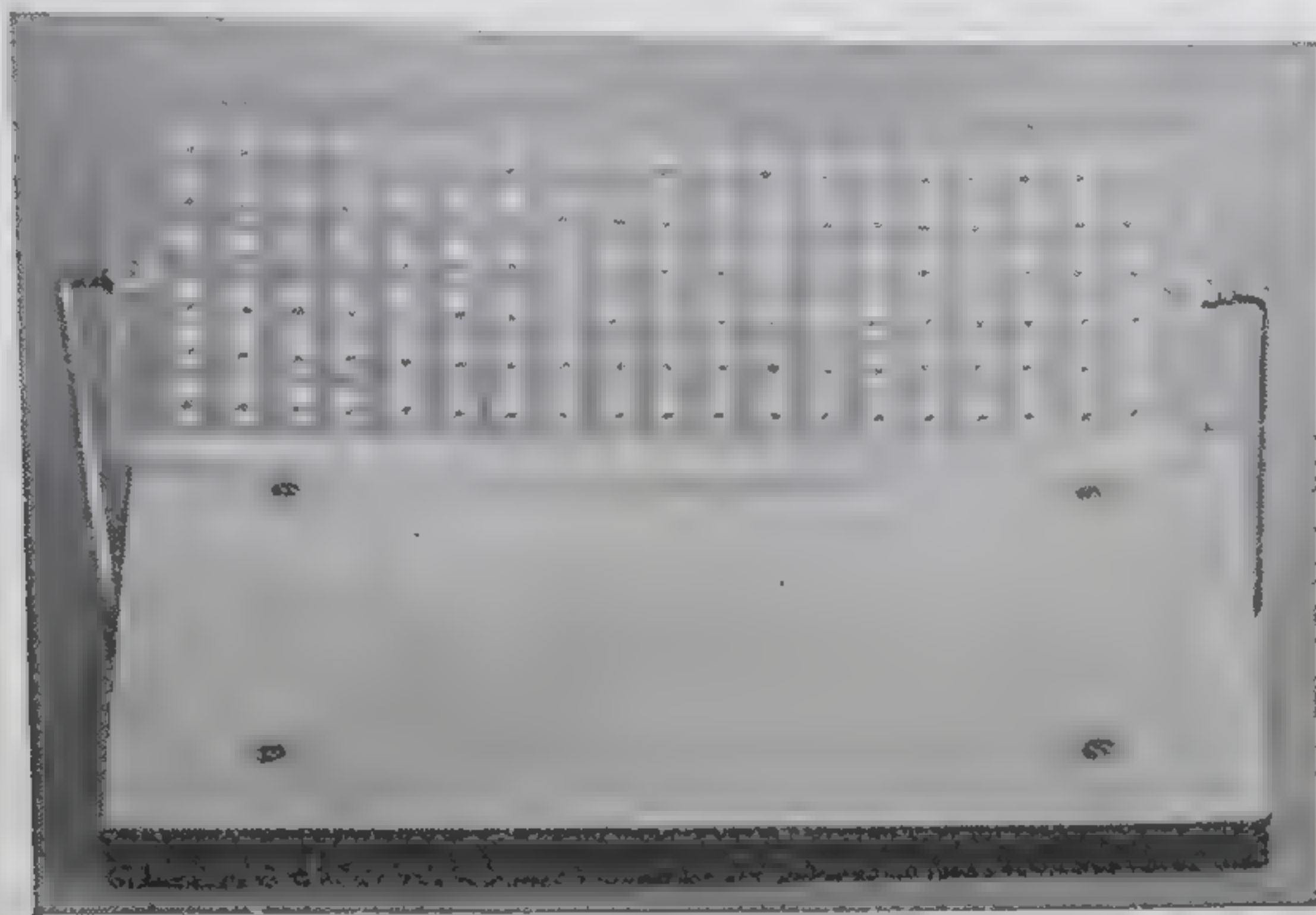


Рис. 2. Шестирядный пластмассовый компаратор на штативе.

ческим стандартом. В этих случаях колориметрический стандарт готовят в среднем гнезде между двумя исследуемыми пробами. Компараторы используются нами и при проведении менее сложных капельных реакций: определения рН, установления концентраций белка по методу Лоури, азота с реактивом Несслера и др.

ДОЗИРОВКА РЕАКТИВОВ

Не менее важной являлась задача разработки приемов дозирования реактивов, обеспечивающих достаточную скорость работы и удовлетворительную воспроизводимость состава реакционных смесей в гнездах компаратора. При проведении капельных реакций удовлетворительная точность и значительная скорость дозирования реактивов могут быть достигнуты при использовании калиброванных капилляров, снабженных баллончиками из плотной резины (рис. 3). Калиброванные капилляры готовят путем перетяжки отрезков стеклянного дроба и последующего разрезания в наиболее узком месте перпендикулярно продольной оси капилляра. Предварительно отбирают капилляры, внешний диаметр которых близок 1,5 и внутренний — 0,75 мм. Затем проводят калибровку капилляров путем определения среднего веса или объема одной капли, отрывающейся от поперечного среза под влиянием силы тяжести. С этой целью тщательно вымытые капилляры под соединяют к бюретке с дистиллированной водой и выпускают по каплям определенный объем воды (2—5 мл). В работе удобны капилляры, цена одной капли которых находится в пределах от $\frac{1}{40}$ до $\frac{1}{60}$ мл. Одновременно рекомендуется проводить тарировку большого числа капилляров, группируя их в наборы по ве-

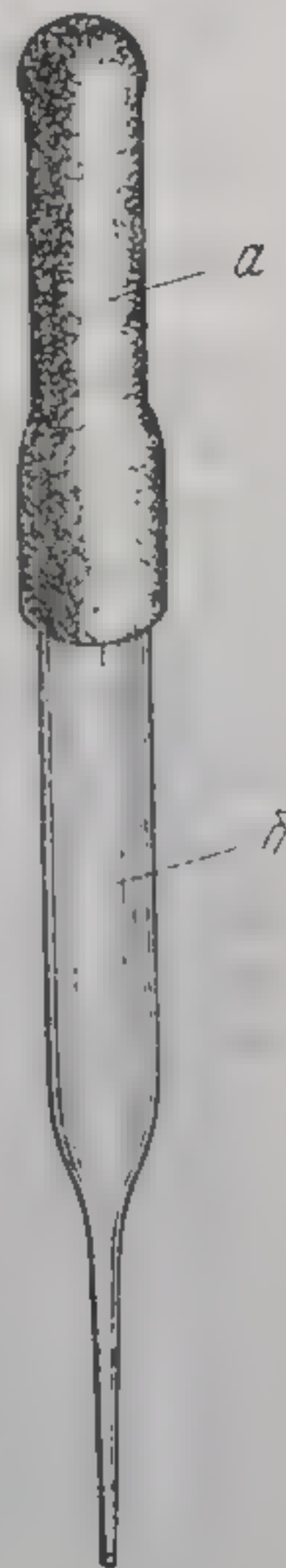


Рис. 3. Калиброванный капилляр с баллончиком.
а — резина; б — стекло.

личине капли. Разница в числе капель, приходящихся на 1 мл воды, для капилляров, комплектуемых в один и тот же набор, не должна превышать единицы. Точность и надежность дозировки реактивов тарированными капельницами была проверена гравиметрическим и титрометрическим путем. При обработке полученных величин статистическим методом показано, что в 95 случаях из 100 отклонение веса капли от средней величины, устанавливаемой при тарировке, не превышает 5%. При увеличении числа капель надежность метода увеличивается.

При работе набором капилляров за каждым реактивом закрепляется определенная капельница. Во избежание перепутывания этикетки реактивов и капельницы маркируют одним и тем же цветом. После окончания внесения реактива в серию гнезд каждая из капельниц должна быть немедленно промыта дистиллированной водой. Практика работы показала, что использование калиброванных капельниц позволяет осуществлять весьма быстрое внесение реактивов в большое число гнезд с достаточной точностью для проведения ориентировочных определений. К числу положительных сторон этого приема следует отнести также отсутствие контакта пипеток с полостью рта работающего.

В случаях, когда точность определений, достигаемая с помощью методов капельного анализа, оказывается недостаточной, внесение реактивов в гнезда пластмассового реактора проводят либо микропипетками, либо калиброванными микроавтоматическими пипетками, либо с помощью микробюреток, одна из разновидностей которых описана ниже.

ПРОВЕДЕНИЕ КАПЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ В ИЗОТЕРМИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Проведение реакций при строго определенных температурах является необходимым условием для количественной оценки интенсивности протекания ферментных реакций. В то же время хорошо разработанная техника капельных реакций на фильтровальной бумаге, фарфоровых пластинках и т. п. не предусматривает приспособлений для их осуществления в изотермических условиях. Учитывая это, мы разработали два варианта устройств для термостатирования компараторов при проведении капельных реакций.

Первый вариант предусматривает размещение пластмассового реактора непосредственно в ультратермостате Геплера (рис. 4). Описанная выше многогнездная пластинка располагается на фоне молочно-белого экрана в специальном проволочном штативе внутри бани термостата на уровне поверхности воды. Верхнее кольцо штатива опирается на бортики отверстия термостатной бани. Нижняя поверхность пластинки омывается жидкостью бани. Экран равномерно освещается снизу дугообразным осветителем, представляющим собой герметически закрытую стеклянную трубку, в которую вставлен ряд последовательно соединенных малогабаритных электрических лампочек. Описанное устройство не требует каких-либо изменений в конструкции термостата и является, таким образом, дополнительным вкладываемым к прибору. Размещение компаратора в ультратермостате позволяет получать удовлетворительное постоянство температуры в гнездах. К числу недочетов данного варианта следует отнести желтоватый оттенок освещения, получаемого от ламп накаливания, снижающий точность колориметрии жидкостей, окрашенных в желтый цвет, и возможность случайного попадания воды из бани в гнезда реактора.

Второй вариант предусматривает устройство компаратора по типу поплавковой камеры. Компаратор выполняется в виде коробки, склеенной из тонкого прозрачного органического стекла (рис. 5). Из такого же материала изготавливают и крышку, снабженную для фиксации положения бортиками.

Дно коробки составляет описанная выше многогнездная пластинка компаратора для капельных реакций. Коробка обладает хорошей плавучестью: при погружении в водный термостат она погружается примерно наполовину.

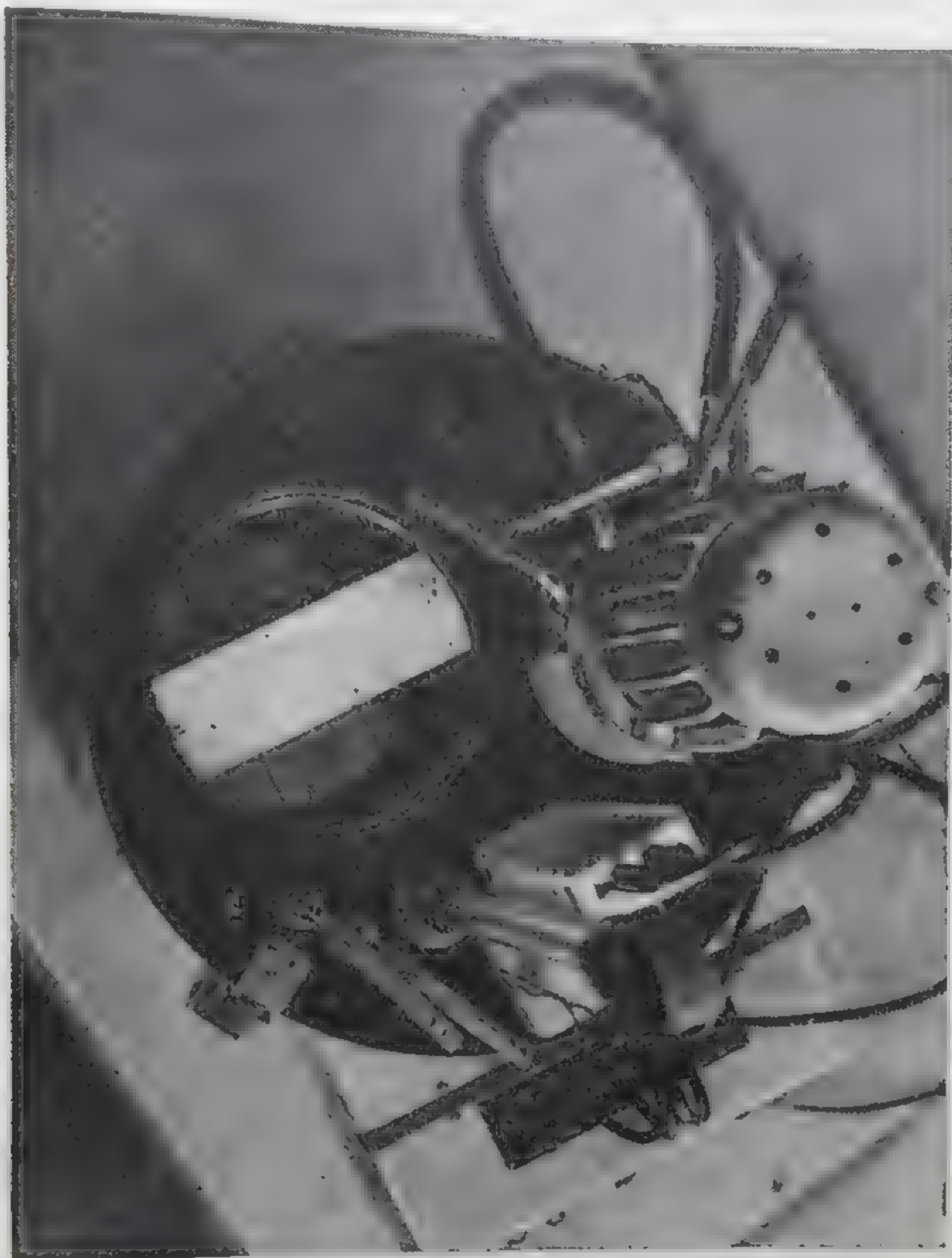


Рис. 4. Расположение пластмассового компаратора в ультратермостате Геплера.

Глубина погружения поплавковой камеры не меняется в зависимости от изменений уровня воды в бане. В результате в камере компаратора создается достаточно постоянный микроклимат. Температура реакционных смесей контролируется миниатюрным термометром, погружаемым в одно из гнезд через отверстие в крышке компаратора.

Предложенная конструкция позволяет размещать компаратор либо в водном термостате (при работе в изотермических условиях, рис. 6), либо вне его на специальном штативе со сменными экранами. Техника производства микрореакций в плавающем компараторе существенно не меняется. Колориметрические и нефелометрические реакции проводят в гнездах, расположенных рядом, путем смешения микрообъемов компонентов реакции, дозируемых с помощью тарированных капельниц либо микробюреток. Реактивы предварительно подогревают до необходимой температуры, для чего в водном термостате устроен специальный пластмассовый штатив. Наблюдают за изменением окраски раствора в процессе реакции проводят, не

вынимая компаратора из термостата, на фоне экрана соответствующего цвета.

В качестве водного термостата может быть использована прямоугольная банка вместимостью 5—8 л, соединенная с помощью резиновых трубок

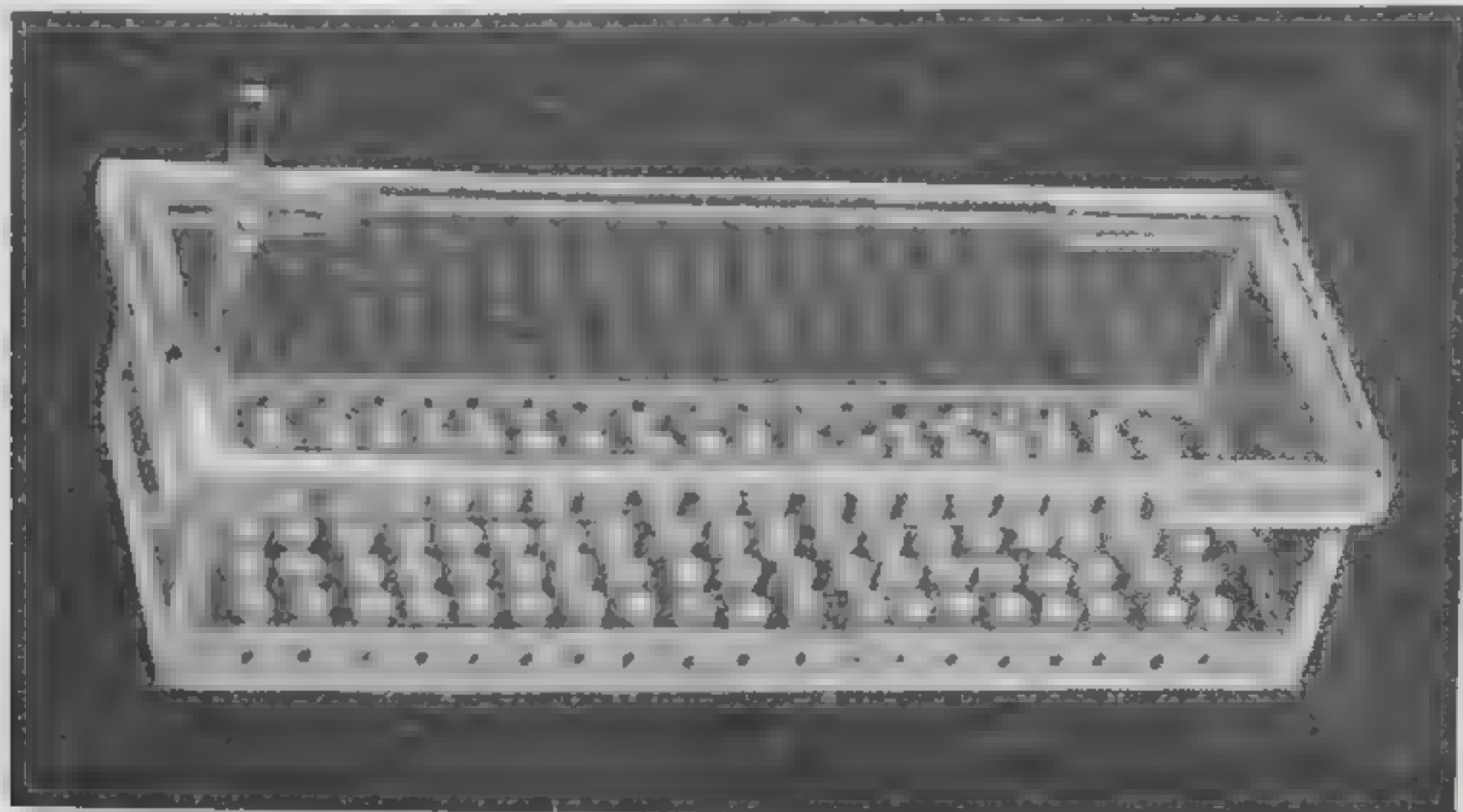


Рис. 5. Плавающий компаратор.

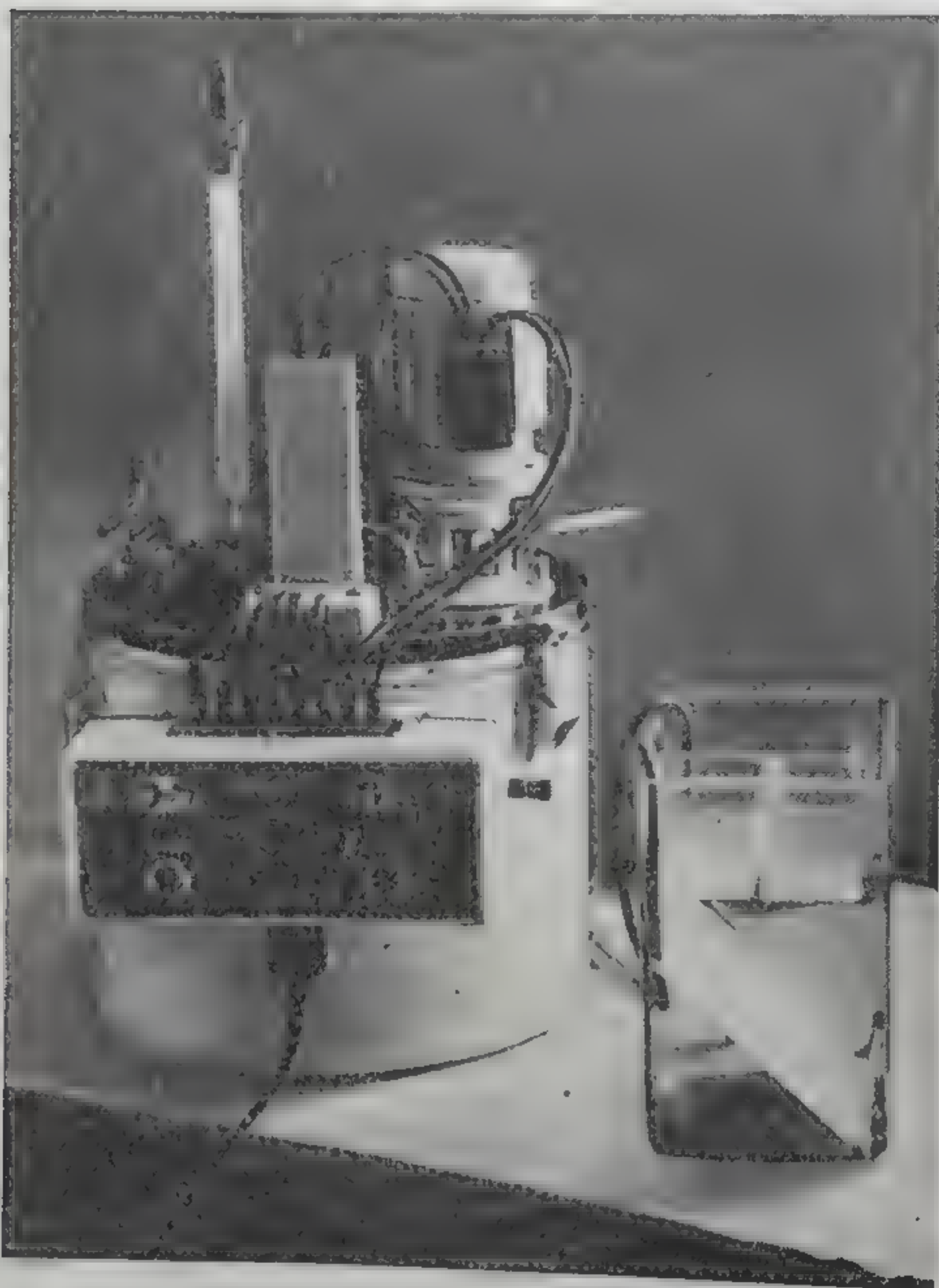


Рис. 6. Плавающий компаратор в водном термостате.

с системой подачи и отбора воды ультратермостата Геплера. Условия термоизоляции бани термостата улучшаются за счет футляра из пенопласта, открытого со стороны падающего света. В случае отсутствия ультратермостата

температура воды в бане может поддерживаться каким-либо иным более примитивным способом в пределах $\pm 0,5^\circ$. На дно банки помещают под углом $35-40^\circ$ сменные пластины из окрашенного органического стекла. Для лучшей циркуляции жидкости пластины по углам снабжены прорезями, пропускающими концы подающей и отбирающей трубок. Для большинства колориметрических реакций пригодны пластины из молочно-белого стекла, а для нефелометрических реакций — пластины, окрашенные в черный цвет.

Плавающий компаратор прошел успешную апробацию при определении активности различных ферментов крови и тканей. При работе с ним в гнездах достигается достаточная стабильность температурных условий. Он достаточно удобен как для ориентировочных визуальных наблюдений за скоростью некоторых ферментных реакций, так и для проведения первой стадии определений, связанных с последующим фотометрированием или титрованием микрообъемов жидкости. Очистка компаратора после производства реакции достигается периодической сменой воды в камере компаратора и протираaniem каждого из гнезд ваткой, намотанной на конец деревянной палочки.

ЭЛЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ КАПЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

Проведение более точных определений ферментной активности в микроколичествах материала на последующих этапах клинического исследования больного невозможно без применения методов объективной электрофотоденситометрии, микротитрования и ряда других аналитических приемов.

В литературе описано значительное количество схем электрофотометрических устройств, предназначенных для измерения оптической плотности в малых объемах жидкости. Для микроколориметрии находят применение капиллярные электрофотоколориметры [8, 9], в которых в качестве микрокювет используются толстостенные капилляры из черного стекла. Однако эти приборы требуют прецизионных устройств, обеспечивающих чрезвычайно точную установку кювет, наличия точечных источников света большой интенсивности. Они малодоступны, так как не выпускаются промышленностью. Работа с капиллярными колориметрами достаточно сложна и трудоемка.

В литературе мы не нашли описания электрофотометрических устройств, предназначенных для колориметрической оценки результатов капельных реакций. В связи с этим мы попытались разработать модели как специального микроденситометра, так и простейшего дополнения к наиболее распространенному в нашей стране электрофотоколориметру ФЭК-М или ФЭК-МН.

Для специального микроденситометра в результате испытания ряда вариантов приборов была избрана дифференциальная схема компенсационного электрофотоколориметра с двумя селеновыми фотоэлементами и непосредственным отсчетом величины оптической плотности по отклонению стрелки гальванометра (рис. 7). Подобная схема позволяет в известной степени компенсировать в ходе измерения окраску (или мутность) исследуемой жидкости и дифференцировать изменения оптической плотности, возникающие вследствие протекания ферментной реакции. Два световых потока проходят вследствие протекания ферментной реакции и через систему ходят через кюветы с исследуемым и контрольным растворами и через систему линз и светофильтров попадают на рабочие поверхности обладающих близкими характеристиками селеновых элементов, последовательно соединенных друг с другом через высокочувствительный стрелочный гальванометр. Таким образом, гальванометр непосредственно измеряет разность силы токов, возникающих в обоих элементах, которая отражает различия в поглощении светового потока контрольным и исследуемым растворами.

Шкала гальванометра разбита на 100 делений. Удобны гальванометры, цена одного деления которых равна $0,1-0,2 \mu\text{A}$, а вся шкала — $10-20 \mu\text{A}$. Перед началом измерений предварительно настраивают прибор, добиваясь, чтобы при заполнении обеих кювет водой стрелка гальванометра стояла точно на нуле, а при полном затемнении окна, соответствующего кювете с исследуемой жидкостью, — на делении 100. При такой настройке показания гальванометра непосредственно отражают оптическую плотность исследуемого раствора, выраженную в процентах.

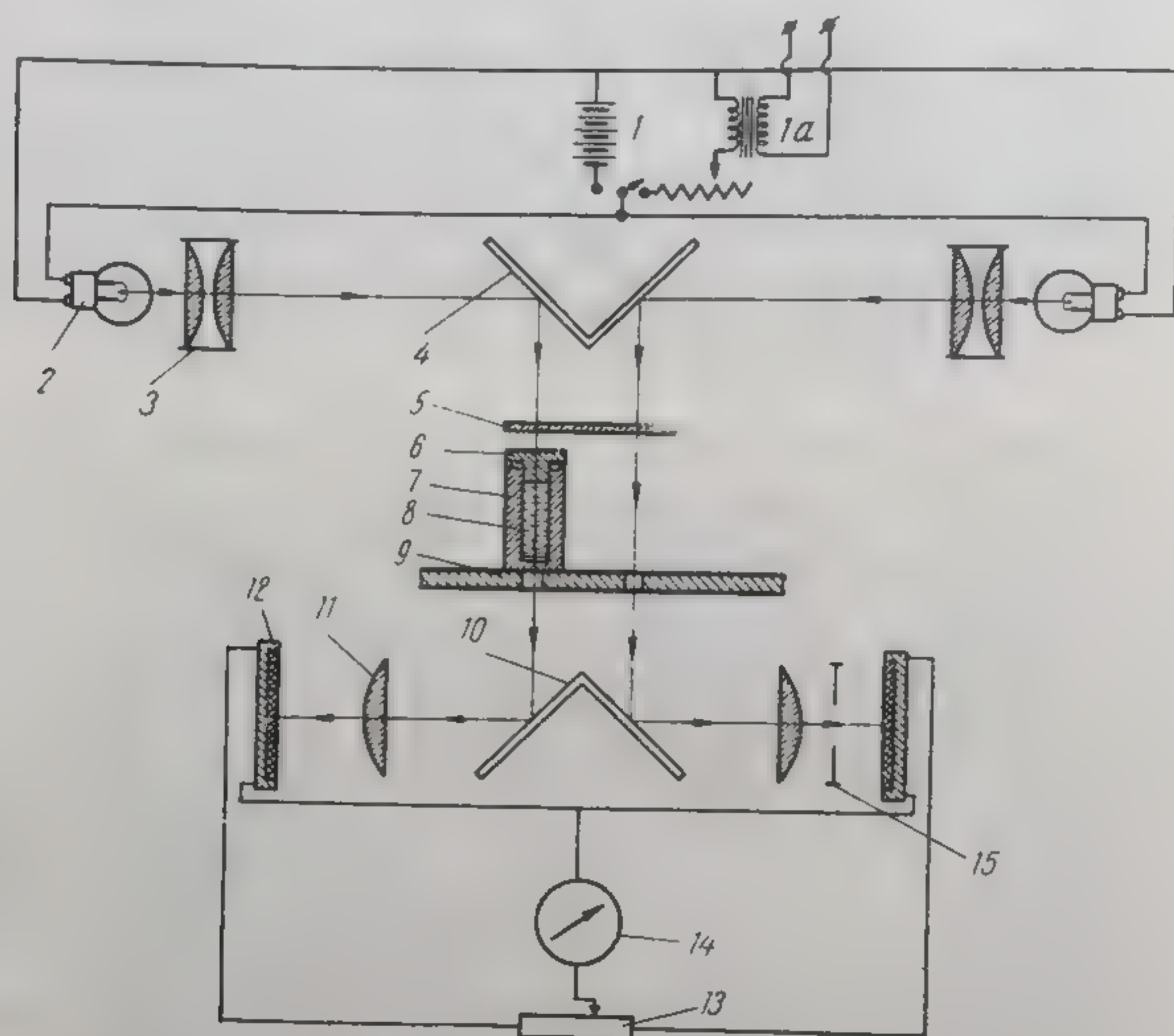


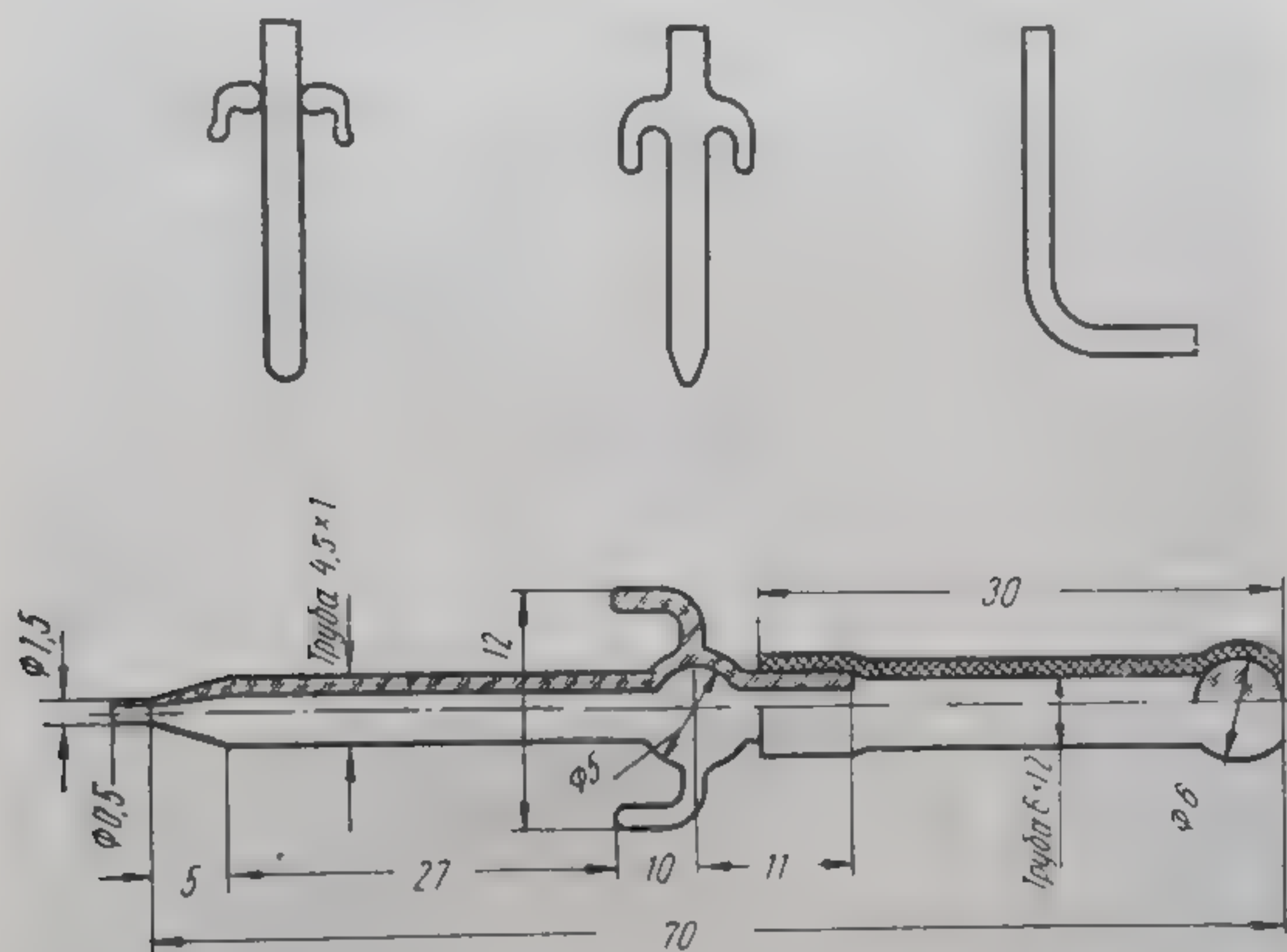
Рис. 7. Схема дифференциального микроденситометра.

1—источник тока; 1а—трансформатор; 2—электролампы; 3—конденсор; 4—зеркало; 5—светофильтр; 6—оптически прозрачная крышка микрокюветы; 7—микрокювета; 8—исследуемая жидкость; 9—часть корпуса колориметра с диафрагмой для светового пучка; 10—зеркало; 11—линза; 12—фотоэлемент; 13—реостат; 14—гальванометр; 15—диафрагма.

Измерение оптической плотности растворов проводят в многогнездных кюветах из органического стекла, по форме и объему соответствующих гнездам компаратора. Для устранения ошибок от влияния формы мениска, образуемого поверхностью жидкости в гнездах перед измерениями, в них вводят погружатели из органического стекла с отшлифованными оптически прозрачными горизонтальными поверхностями. Последние погружаются в жидкость, находящуюся в гнезде, заключая между дном и горизонтальной поверхностью погружателя слой жидкости строго определенной толщины.

Для проведения капельных реакций и осуществления замеров оптической плотности сконструированы многогнездные кюветы с различной высотой гнезд, позволяющие проводить колориметрию различных по толщине слоев жидкости. Апробация прибора показала возможность получения вполне удовлетворительных результатов при использовании его для измерения оптической плотности микроколичеств растворов. К сожалению, техника изготовления подобных колориметров и кювет достаточно сложна, а промышленный выпуск их не налажен.

В результате многочисленных испытаний мы пришли к выводу, что наиболее удобной формой кюветы, обеспечивающей серийность и значительную скорость проведения измерений, является форма несколько укороченной (по сравнению с описанными выше) капельницы. Подобная кювета удобна при извлечении жидкости из гнезд компаратора и легко промывается. От-



метим, что использование цилиндрических кювет при электрофотокolorиметрии не является новым. Цилиндрические кюветы применялись в универсальном колориметре Ланге, микроэлектрофотокolorиметре Коренмана и Туманова, в котором им была придана форма пипетки, и ряде других приборов [10, 11]. К сожалению, использование цилиндрических кювет, как правило, приводит к значительному снижению точности, так как оптическая поверхность стеклянного дрота не бывает достаточно равномерной. Экспериментальная проверка точности измерений при использовании цилиндрических кювет, выполненных даже из одного и того же отрезка дрота, показала неудовлетворительные результаты, особенно при измерении оптической плотности слабоокрашенных растворов. Более того, даже при использовании одной и той же кюветы малейшее перемещение ее в гнезда колориметра как по длине, так и по радиусу приводило к значительным колебаниям экстинкции, резко влияющим на точность измерений. Удалось показать, что при работе с цилиндрическими кюветами можно добиваться точности, мало отличающейся от обычных показателей ФЭК, если использовать одну и ту же кювету, применив устройства, обеспечивающие строгую фиксацию ее положения.

321

вуют описываемые ниже кюветы и вкладыши к ФЭК, предназначенные для колориметрии микроколичеств жидкости.

А. Кюветы представляют отрезки бесцветного тонкостенного дрота, оформленные в виде капельных пипеток с расширением и приливами, фиксированные в гнезде фотоколориметра.

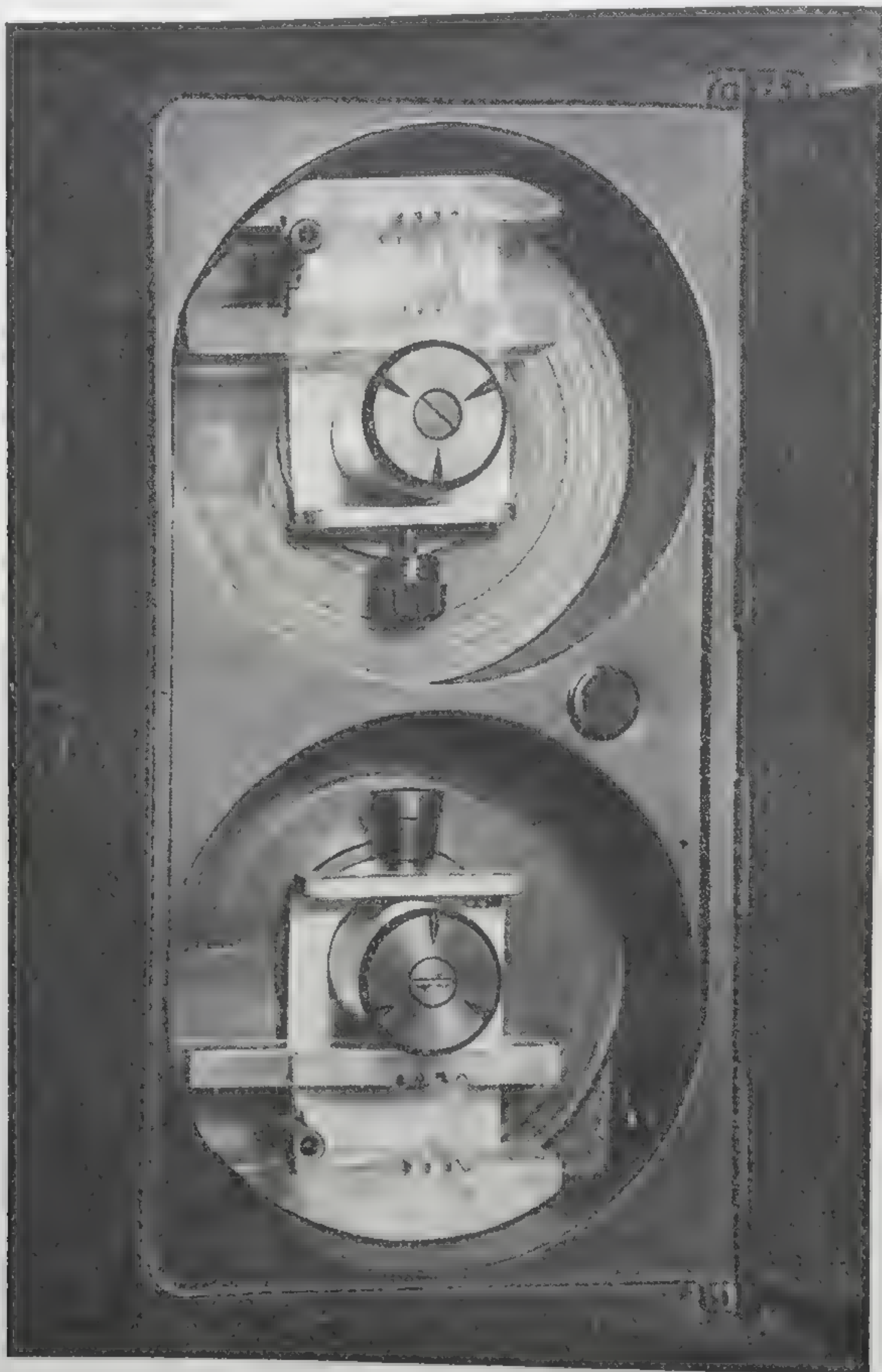


Рис. 9. Вкладыш к ФЭК для микроденситометрии в гнезде фотоколориметра.

сирующими глубину погружения и фронтальное положение кюветы (рис. 8), либо в виде микропипеток с аналогичными стеклянными приливами. Форма кюветы выбирается в зависимости от исследуемого материала.

Более универсальной и удобной для серийных исследований является форма капельницы. Объем кювет, равно как и соответствующий им диаметр кассеты вкладыша, может меняться в зависимости от интенсивности окраски и измеряемых объемов. Удобны кюветы с рабочим объемом 0,1—0,15 мл (внутренний диаметр дрота 3—4 мм).

Б. Вкладыши к ФЭК помещают на место извлекаемых из прибора держателей кювет (рис. 9). Вкладыш состоит из алюминиевого основания со стопорным винтом, на котором монтируются пластмассовые щеки, цилиндрическая линза и латунная кассета с вертикальной щелью и пружиной для

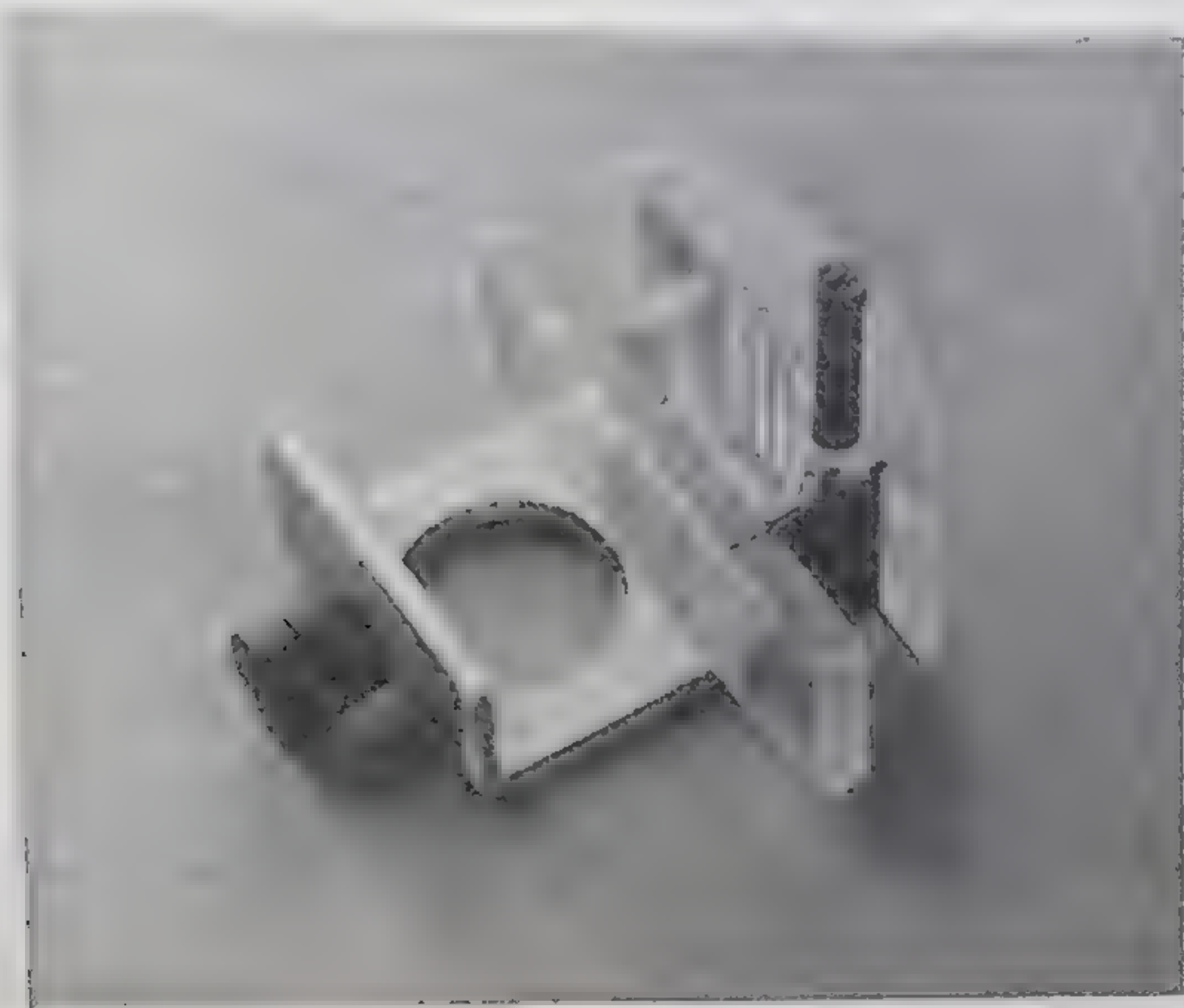


Рис. 10. Расположение микрокюветы во вкладыше.

фиксации кюветы (рис. 10). Схема хода лучей в колориметре со вкладышем изображена на рис. 11. Пучки света, выходящие из конденсорных линз фотоколориметра, падают на цилиндрические линзы вкладышей и фиксируются в виде вертикальных линейных пучков на щелях кассет. Проходя через заполненную жидкостью кювету, которая в свою очередь представляет по сути дела двояковыпуклую цилиндрическую линзу, пучок света вновь рассеивается, относительно равномерно освещая рабочую поверхность фотоэлемента.

Кассета для кюветы представляет слегка пружинящую обойму из листовой латуни толщиной 0,3—0,5 мм, плотно облегающую кювету. Соответственно передней и задней выпуклостям в ней прорезаны вертикальные щели шириной 3 мм и длиной 20 мм. Выпуклая часть кассеты переходит в плоские боковые отростки, плотно входящие в поперечные пазы щек и разгораживающие, таким образом, вкладыш на переднюю и заднюю половины.

Точно воспроизводимое расположение кюветы по отношению к оптической оси прибора является главным условием получения удовлетворительной точности измерений. Она достигается: а) фиксацией вкладыша на оптической оси прибора с помощью стопорного винта, б) прочным креплением кассеты во вкладыше, в) наличием пружины, фиксирующей кювету в строго определенном положении по отношению к щели, г) наличием на кювете стеклянных приливов, совпадающих после ее введения в гнездо с определенными точками кассеты. Эти стеклянные упоры не только определяют глубину погружения кюветы, но и исключают возможность ее смещения вокруг вертикальной оси.

При работе со вкладышем в гнезда правой и левой кассет вводят пронумерованные кюветы, наполненные дистиллированной водой, ставят правый барабан на ноль шкалы оптической плотности и вращением оптических

клиньев добиваются равенства интенсивности световых потоков. Проверяют надежность фиксации вкладыша в кювете путем многократного вынимания и помещения кюветы в гнездо кассеты, при этом стрелка гальванометра должна возвращаться на нулевое деление. Затем растворитель в правой кювете заменяют на исследуемый раствор. При засасывании последнего из гнезда компаратора кончик кюветы во избежание разливания раствора вводят в гнездо постепенно, по мере забора жидкости. Кювету тщательно обтирают марлей, помещают в правое гнездо и вращением барабана возвращают стрелку гальванометра на ноль. Величину оптической плотности

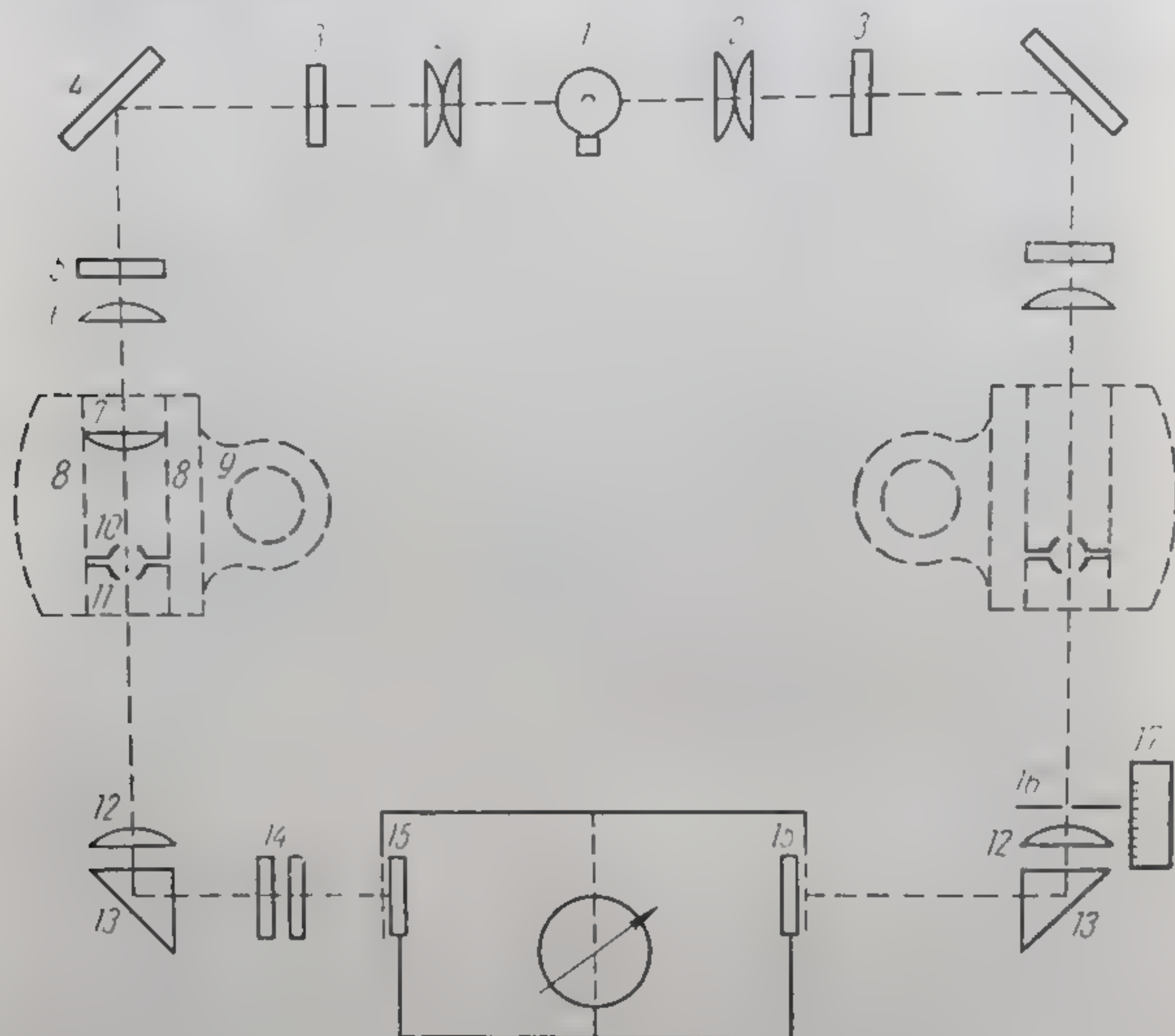


Рис. 11. Схема хода лучей в фотоколориметре со вкладышем.
1—электролампа; 2—конденсоры; 3—теплозащитные стекла; 4—зеркало;
5—светофильтры; 6—линзы; 7—цилиндрическая линза; 8—пластмассовый корпус вкладыша; 9—алюминиевое основание вкладыша; 10—латунная кассета; 11—микрокювета; 12—линза; 13—призма; 14—нейтральные клинья; 15—фотоэлементы; 16—щель; 17—шкала.

отсчитывают по шкале правого барабана. Техника снятия стандартных кривых и расчета концентраций не отличается от общих правил работы с ФЭК. Однако всю работу следует проводить только на той паре кювет, на которой проводилось построение калибровочных кривых. При замене кювет необходима проверка калибровочного графика и внесение в него соответствующих коррективов. Практическая проверка описанных кювет и вкладышей при колориметрии ряда продуктов капельных цветных реакций выявила вполне удовлетворительную точность измерений экстинкции (мало отличающуюся от точности работы ФЭК с обычными кюветами) и возможность осуществления с их помощью быстрых серийных фотометрических измерений интенсивности окраски продуктов капельных реакций.

ОТДЕЛЕНИЕ ЖИДКОСТИ ОТ ОСАДКА

Многие процедуры биохимического анализа и, в частности, определения ферментной активности связаны с необходимостью освобождения исследуемого раствора от осадка. При работе с микроколичествами фильтрова-

ние, центрифугирование и декантирование имеют определенные особенности. Для капельных реакций мы попытались разработать возможно более простые, не требующие дополнительного оборудования технические приемы.

В ряде случаев осаждение оказалось возможным проводить непосредственно в гнездах пластмассового компаратора. Для фильтрации в этих случаях удобно использовать тарированные капельницы с шарообразными расширениями с присоединенными к ним насадками для фильтрации. Последние представляют небольшие отрезки стеклянных трубочек с оттянутым в виде воронки концом. В устье воронки вставляют небольшое количество мезги из фильтровальной бумаги, а ее оттянутый конец соединяют в стык с концом капельницы с помощью кусочка ниппельной резины. При фильтрации сдавливают резиновый баллончик капельницы и погружают конец насадки в гнездо с фильтруемым раствором (рис. 12); опуская баллончик, создают небольшое отрицательное давление над насадкой, в результате чего жидкость проходит через слой мезги и поступает в капельницу осветленной. После окончания фильтрации насадку с ниппельной резиной удаляют, а фильтрат разносят по гнездам, в которых проводится вторая стадия реакции.

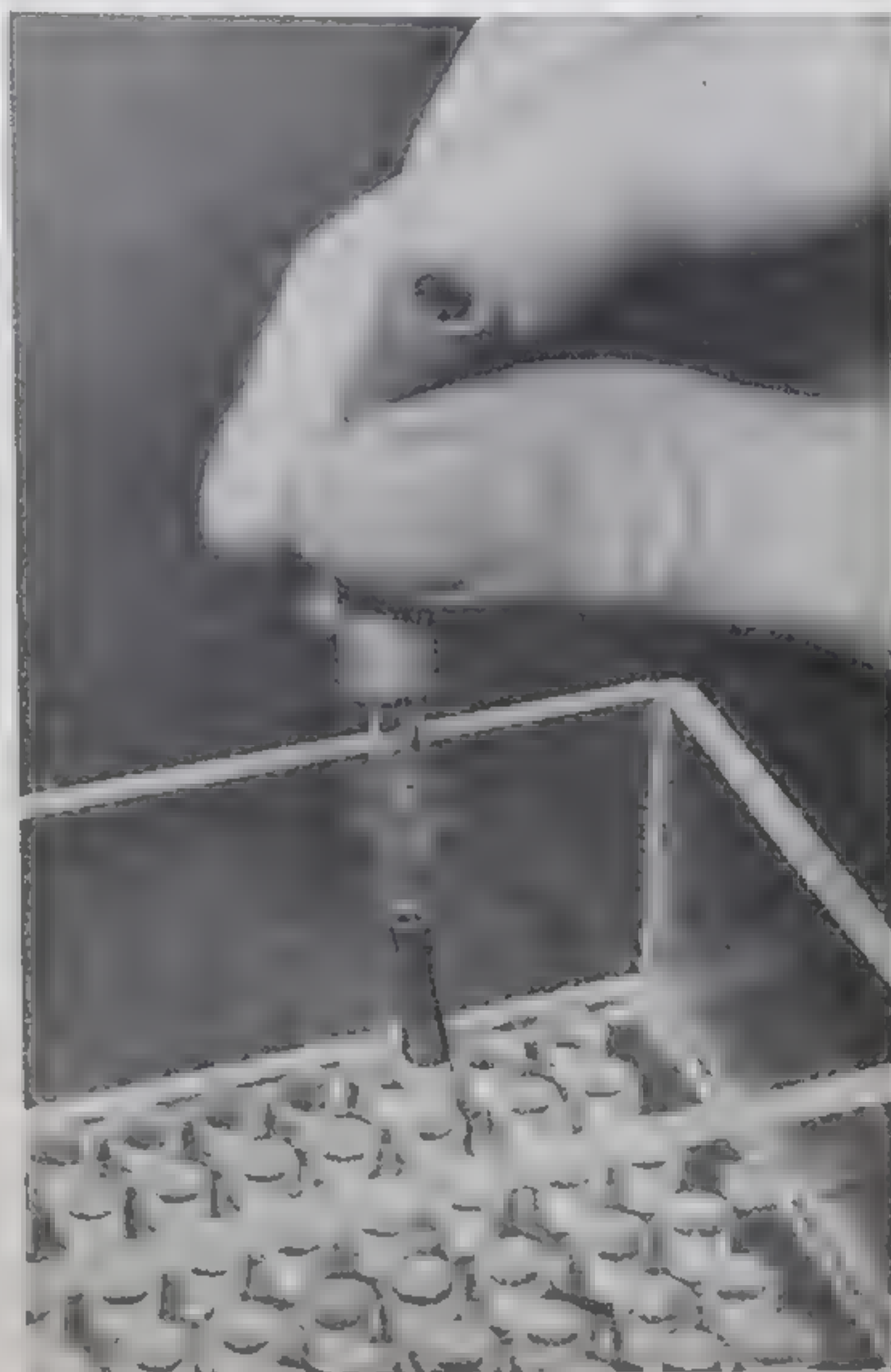


Рис. 12. Микрофильтрация с помощью тарированной капельницы.

В ряде случаев удовлетворительные данные могут быть получены в результате отстаивания взвесей или отделения осадков центрифугированием в микропробирочках. Отсасывание жидкости над осадком в обоих указанных случаях удобно проводить с помощью стандартной капельной пипетки с отогнутым кончиком.

ПОЛУЧЕНИЕ РЯДОВ РАЗВЕДЕНИЙ

При проведении некоторых клинико-биохимических и иммунологических исследований возникает необходимость получения рядов с различными постепенно нарастающими разведениями исследуемого материала (определение амилазы по Вольгемуту, проведение некоторых осадочных реакций, реакций преципитации и т. п.). Использование описанных выше компараторов и калиброванных капельниц позволяет значительно ускорить получение подобных рядов.

Для получения ряда в гнезда обычного компаратора вносят по 3 капли растворителя (обычно воды, физиологического или буферного растворов). В первое гнездо ряда вводят 3 капли исследуемой жидкости. Вбирая и выпуская жидкость капельной пипеткой, тщательно перемешивают содержимое первого гнезда и 3 капли смеси переносят в последующее. Смесь, осевшее первое гнездо и 3 капли смеси переносят в первое гнездо. Указанную процедуру повторяют необходимое число раз. В результате получают ряд раз-

ведений. Концентрация исследуемого материала в каждом последующем гнезде убывает по сравнению с предыдущим вдвое. Точность приготовления разведений капельным методом вполне достаточна при ориентировочных количественных исследованиях, для которых используются подобные ряды. В то же время капельная техника значительно ускоряет процедуру приготовления ряда и приводит к большой экономии реактивов.

МНОГОГНЕЗДНЫЕ КЮЕТЫ ДЛЯ МИКРОДИФФУЗИИ

Для некоторых ферментов конечная стадия определения их активности связана с процессами освобождения, отгонки и измерения количества газообразных продуктов реакции. Так, при определении активности ферментов, гидролизующих амиды, — глютаминазы, аспарагиназы, а также различных дезаминирующих систем, дезаминаз аминокислот, моно- и диаминооксидаз — возникает необходимость определения освобождающегося аммиака. Распространение получили методы, основанные на изотермической перегонке аммиака в чашках Конвея и особенно в парафиновых чашках Мардашева — Лестровой [12, 13], представляющих изолированные от атмосферы двухкамерные или трехкамерные кюеты, сообщающиеся между собой посредством воздушного канала. Известны многочисленные видоизменения микродиффузионных сосудов, различающихся как по форме, так и по размерам [14 — 16]. Обычно при определении ферментной активности освобождающийся при реакции аммиак вытесняется щелочью в изолированное от внешней среды пространство, сообщаемое с соседней кюетой, содержащей определенное количество кислоты, которая служит для поглощения аммиака. О количестве образующейся соли аммония судят либо при помощи алкалометрического титрования, либо на основании интенсивности окраски, образующейся в результате взаимодействия аммиака с реактивом Несслера. Титрометрический метод точнее и проще, колориметрический же отличается весьма высокой чувствительностью и имеет определенные преимущества при определении очень малых количеств аммиака. В связи с этим мы попытались разработать методику, пригодную как для колориметрических, так и титрометрических измерений.

Благоприятные результаты были получены при использовании в качестве реакторов многогнездных пластмассовых пластин, напоминающих описанные выше компараторы. Однако в кюетах для микродиффузии цилиндрические гнезда группировались попарно, причем верхняя часть перегородки между каждой парой гнезд снималась примерно на одну треть общей высоты. В результате после закрывания пары гнезд крышкой между ними образовывался ход воздушного сообщения. Испытание ряда пластических масс для изготовления подобных кюет показало, что органическое стекло, полихлорвинил и полиэтилен непригодны для этой цели; при продолжительном стоянии растворов кислоты и щелочи в гнездах, высверленных в пластинках из перечисленных материалов, наблюдалась экстракция примесей, существенно нарушавших развитие окраски при реакции Несслера. Спустя непродолжительное время после добавления реактива Несслера к содержимому гнезд в них образовывалась значительная муть, препятствующая фотометрированию. Удовлетворительные результаты получены только с полистиролом и некоторыми образцами фторопласта-4. Однако полистирол во много раз дешевле фторопласта и его производство освоено в промышленном масштабе. В связи с этим для практического использования предлагаются многогнездные кюеты для микродиффузии, представляющие брусок из полистирола с высверленными в нем парными гнездами и притертыми крышками из прозрачного органического стекла (рис. 13).

Вблизи края каждой крышки просверливают отверстие диаметром в 3 мм, позволяющее при ее перемещении разобщать или соединять одно из гнезд кюветы с атмосферой. Более универсальными, пригодными для работы практически со всеми реактивами являются аналогичные кюветы, снабженные стеклянными вкладышами. Удобны пластинки, включающие 12-24 спаренных гнезда.

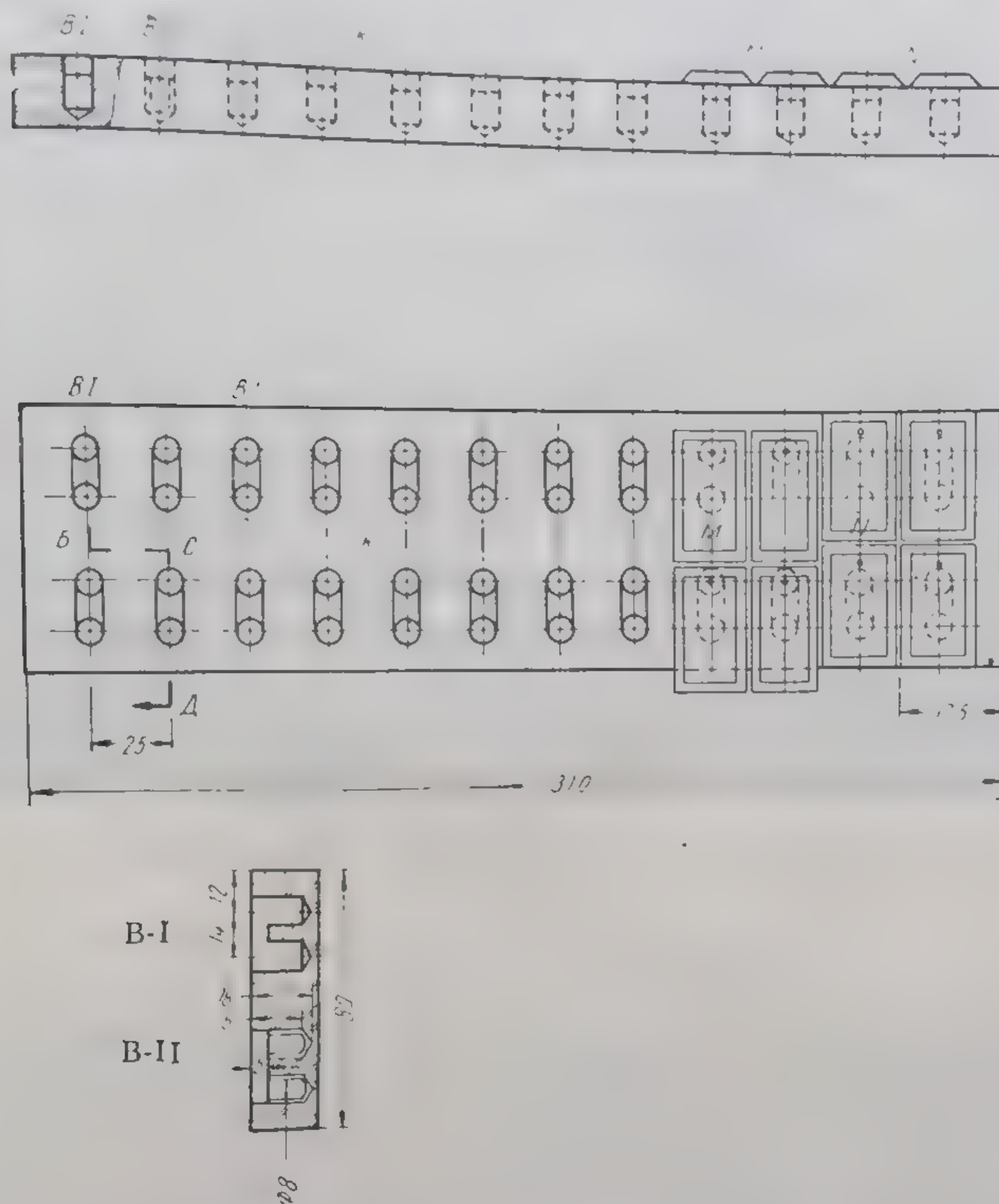


Рис. 13. Прибор для микродиффузии в 24 пробах.

K — открытые гнезда; *M* — гнезда прибора закрыты крышками и подготовлены для введения щелочи; *N* — гнезда прибора изолированы от атмосферы для проведения микродиффузии; *BI* — вариант I — пластмассовые гнезда; *BII* — вариант II — гнезда со стеклянными вкладышами.

Техника работы с кюветами для микродиффузии сводится к заполнению одного из гнезд субстрат-ферментной смесью и второго соответствующим поглотителем газообразного продукта реакции (в случае определения аммиака — 0,01 N серной кислотой). Кюветы экспонируют заданное время при изоляции от атмосферы; затем к ним притирают крышки и ферментную реакцию прерывают введением через отверстие реактива, вытесняющего продукт реакции (при определении активности дезаминаз и дезамидаз концентрированного раствора щелочи или поташа). Перемещая крышки, изолируют кюветы от атмосферы и оставляют на срок, необходимый для полного перехода

да продукта реакции в растворитель. Последний определяется либо путем фотометрирования окрашенных продуктов реакции в описанном выше вкладыше к ФЭК, либо с помощью микротитрования (рис. 14).

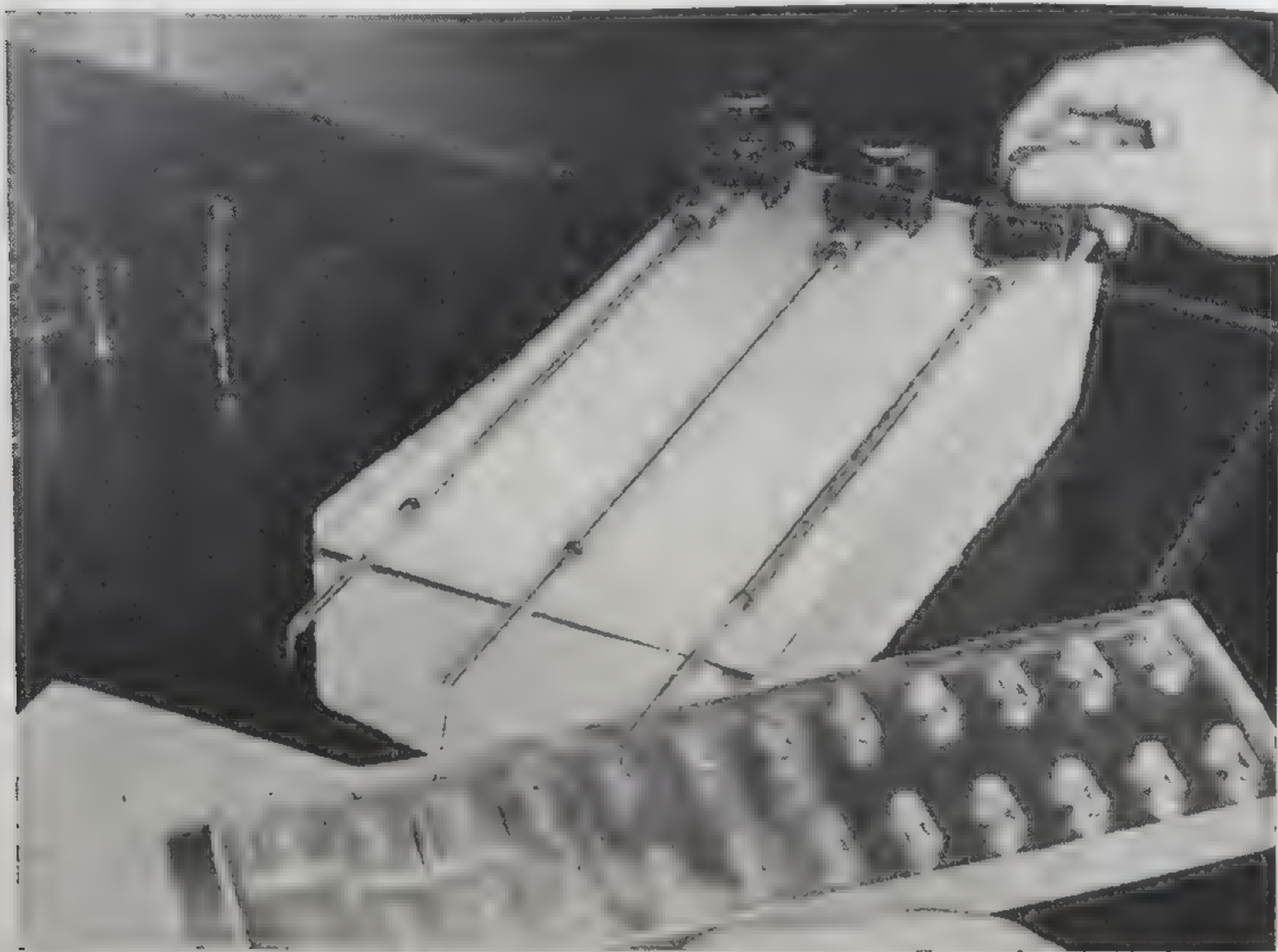


Рис. 14. Титрование проб непосредственно в приборе для микродиффузии.

ПРОСТЕЙШИЕ МИКРОБЮРЕТКИ

Для микротитрования и точного серийного дозирования микроколичеств реактивов в гнезда пластмассовых реакторов были разработаны простейшие микробюретки, изготовление которых легко может быть осуществлено в любой лаборатории. За основу взяты стандартные, выпускаемые промышленностью микропипетки, точность градуировки которых предварительно проверяется гравиметрическим или титрометрическим путями.

Для устранения ошибок от «натекания», достигающих при дозировании микрообъемов значительных величин, бюретки располагались в горизонтальном положении. Концы бюреток загибали под углом 90° и оттягивали в виде тонких кончиков, препятствующих свободному вытеканию жидкости в силу поверхностного натяжения. Вторые концы пипеток закрывали отрезками эластичной полувакуумной резины. Сжиманием и разжиманием этих эластичных баллончиков с помощью винтовых зажимов в бюретке создавали небольшое положительное или отрицательное давление, позволяющее набирать или выпускать из бюретки необходимые количества жидкости. При небольших степенях давления жидкость вытекает из бюретки только после погружения кончика бюретки в титруемый раствор. Изменение давления в бюретке позволяет достаточно тонко регулировать скорость вытекания жидкости.

Для лучшего наблюдения за уровнем жидкости бюретки монтируют на пластине из молочно-белого органического стекла. В целях серийного до-

зирования ряда реактивов на одной пластине монтируют несколько микро-
бюреток (рис. 15). Для лучшего видения мениска жидкости на пластине под
каждой бюреткой несмываемой краской наносят синие или красные линии.

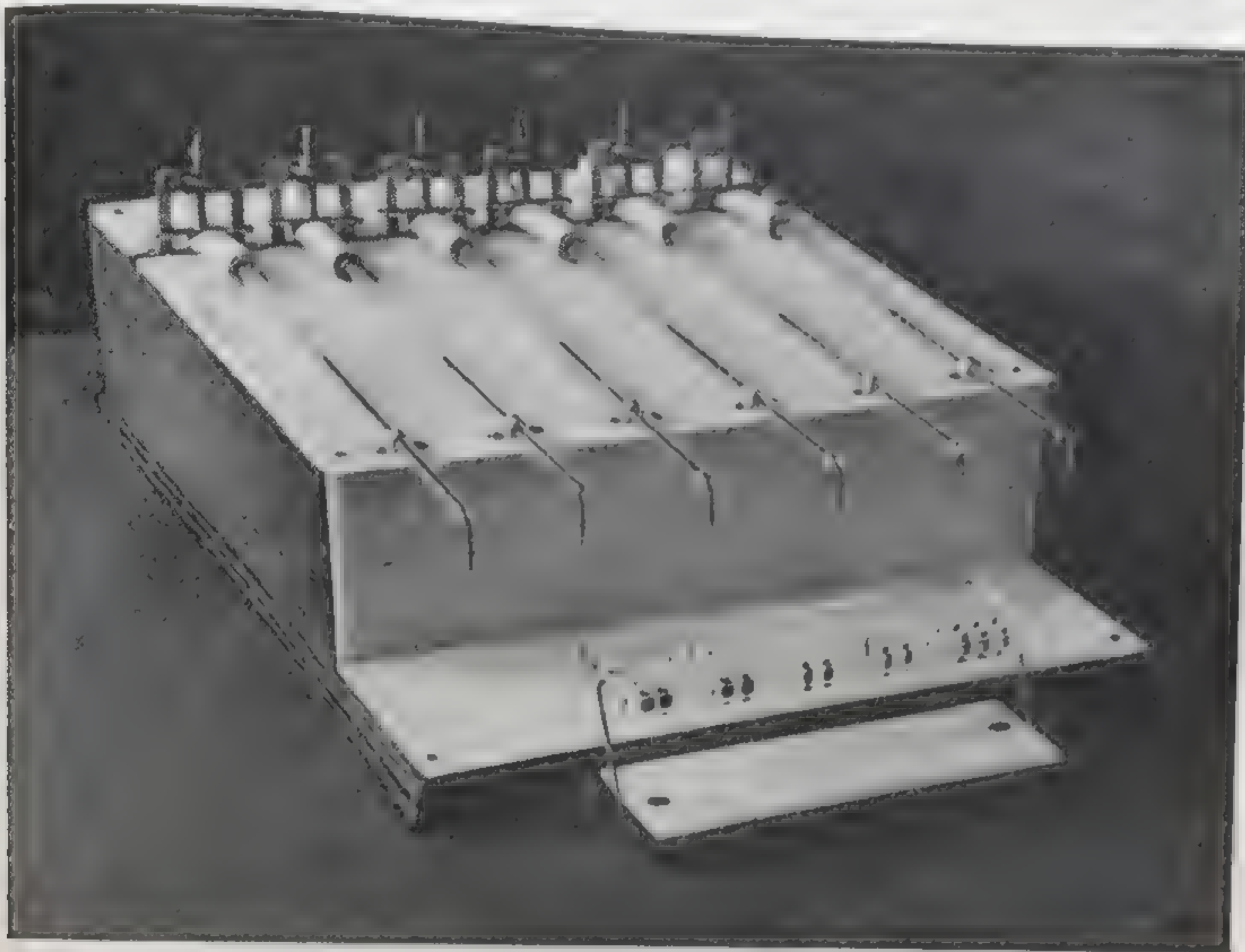


Рис. 15. Простейшие горизонтальные микробюретки на штативе.

ОСВЕЩЕНИЕ

Использование при проведении капельных реакций приемов визуаль-
ной колориметрии и нефелометрии заставляет придавать существенное зна-
чение условиям стандартной освещенности экрана компаратора для прове-
дения капельных реакций. Опыт работы показывает, что более точных ре-
зультатов визуальной оценки можно добиться при естественном освещении.
Освещение экрана лампами накаливания при колориметрии растворов желто-
го цвета несколько снижает точность измерений. В связи с этим рационально
использование люминесцентных ламп дневного света. Нами применяются
осветители, смонтированные из двух ламп дневного света, снабженные реф-
лекторами, позволяющими менять направление и интенсивность падающего
на экран светового потока (рис. 16).

ПОДГОТОВКА КРОВИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Большинство методов определения ферментной активности крови пре-
дусматривает предварительное отделение плазмы от клеток или получение
сыворотки. Обе эти процедуры даже при работе с пробирочками для микро-
анализа требуют относительно больших (0,5—1 мл) объемов крови, а
при работе с обычными пробирками — нескольких миллиметров крови.

Получение таких количеств крови при серийных определениях актив-
ности фермента у одного и того же больного затруднительно. В связи с этим
нами разработаны два приема определения ферментной активности в мини-
мальных объемах крови.

Первый прием сводится к определению ферментной активности непосредственно в гемолизатах с использованием субстратов, позволяющих дифференцировать активность ферментов, локализованных в клетках и плазме. Прием использован, например, в целях одновременного изучения активности ацетилхолинэстеразы эритроцитов, неспецифической холинэстеразы и али-

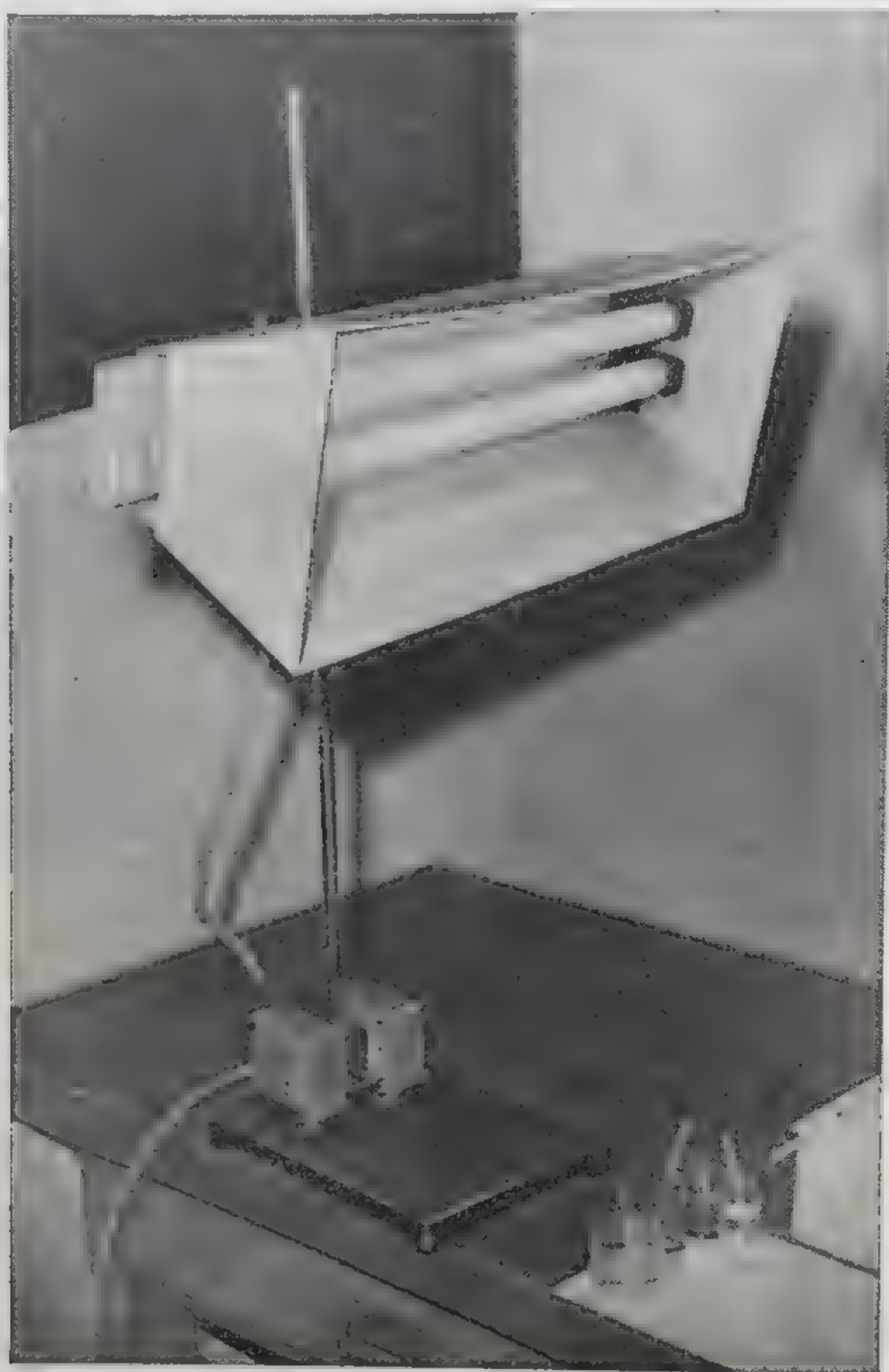


Рис. 16. Люминесцентный осветитель для микротитрования и визуальной колориметрии.

эстеразы плазмы. Для определения активности второго фермента применен бутирилхолин, который, как известно, расщепляется только неспецифической холинэстеразой; для определения алиэстеразы — трибутирин. Техника определения сводится к измерению оптической плотности гемолизата с индикаторно-буферной смесью, цвет которой меняется при гидролизе эфиров в результате изменения рН. При использовании ФЭК измерения проводят при красном светофильтре.

Второй прием сводится к получению изотонических экстрактов крови или тканей. В этих случаях небольшой объем крови (0,1—0,2 мл) смешивают

с пятикратным объемом физиологического раствора. После центрифугирования получают прозрачный бесцветный раствор плазмы. В случае необходимости исследования ферментной активности эритроцитов последние отмывают от следов плазмы и подвергают гемолизу в заданном количестве дистиллированной воды, обычно пятикратном по отношению к первоначальному объему крови. В дальнейшем получают раствор плазмы и гемолизат, которые используют для определения ферментной активности.

Таковы основные микроаналитические приемы и оснащение, используемые нами (в сочетании с хроматографией, электрофорезом и т. п.) при разработке микроэкспресс-методов определения ферментной активности и некоторых других биохимических методов. На их основе разработаны как ориентировочные (капельные), так и достаточно точные методики определения активности отдельных ферментов. Главной особенностью этих методов является возможность одновременного проведения серийных определений в микрокапле крови активности не одного, а ряда ферментов. В результате удастся определять ферментный спектр или ферментную формулу крови, отражающую соотношение активностей отдельных ферментных систем.

На основе изложенной техники микроанализа в настоящее время удалось разработать микроэкспресс-методы определения активности более чем 15 ферментов, а также осуществления ряда более распространенных в клинической практике биохимических тестов (определение общего и остаточного азота, белка сыворотки крови, холестерина, фосфолипидов и др.)

Опытная партия оснащения для проведения микроанализа по указанному методу выпущена московским заводом «Технолог».

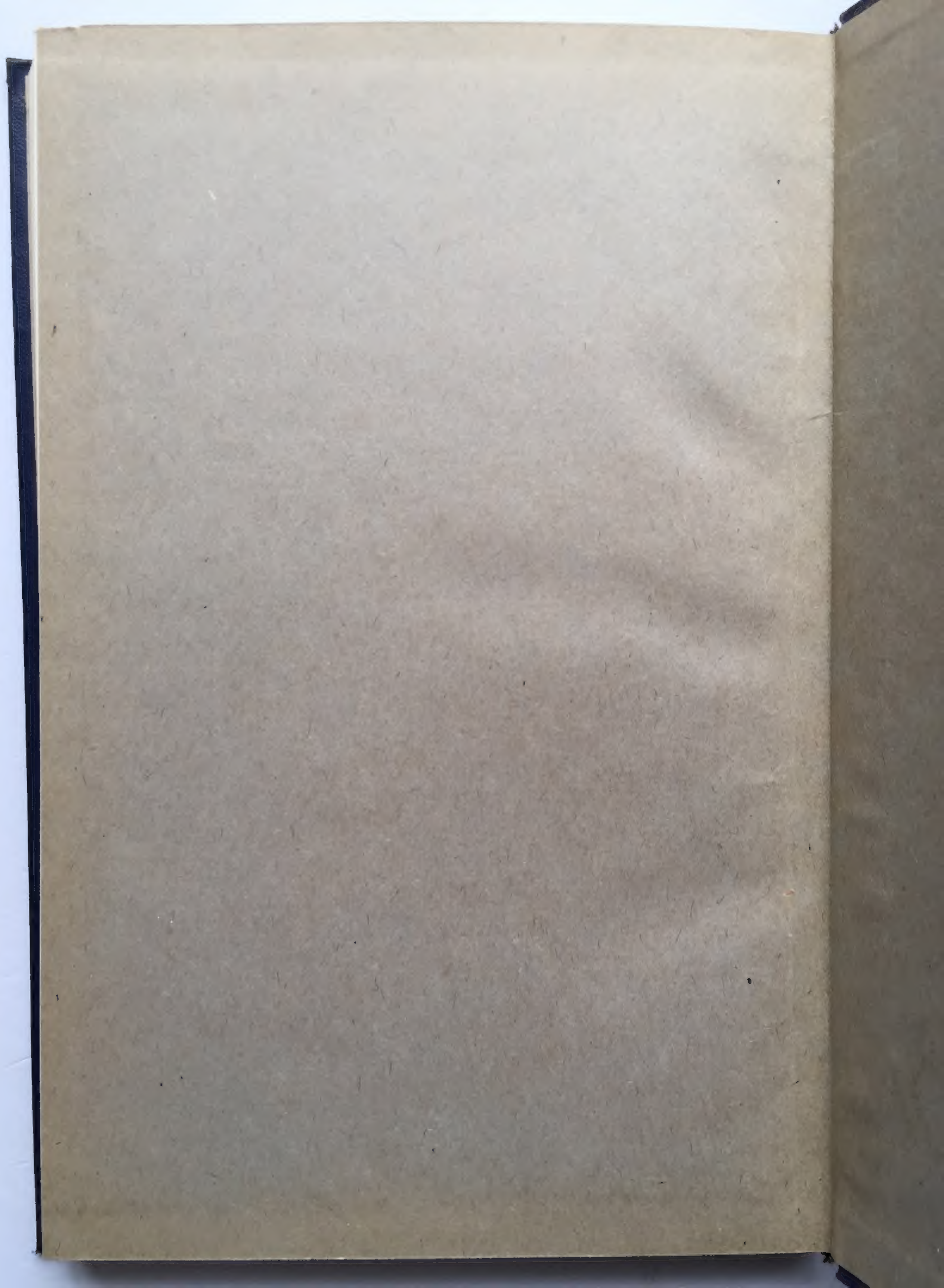
ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский А. Вопросы медицинской химии, 1960, 4, 228.
2. Кирк Н. Количественный ультрамикроанализ, 1952.
3. Бенедетти-Пихлер Д. Техника неорганического микроанализа.
4. Wilson C. *Microchim. acta*, 1956, 1—3, 91.
5. Тананаев Н. Капельный анализ. Госхимиздат, 1954.
6. Тананаев Н. Дробный анализ. Госхимиздат, 1950.
7. Файгель Ф. Капельный анализ. Госхимиздат, 1935.
8. Троицкий Г. Прикладная химия, 1933, 6.
9. Hansen G. *Microchim. acta.*, 1956, 1—3, 406.
10. Lange B. *Kolorimetrische Analyse*. Berlin, 1944.
11. Коренман М., Туманов Д. Заводск. лабор., 1952, 18, 253.
12. Cowan E., Wigne A. J. *Biochem.*, 1933, 27, 419.
13. Мардашев С., Лестровая Н. Вопросы медицинской химии, 1949, 1, 1—2, 203.
14. Borsook H. J. *Biol. chem.*, 1935, 10, 481.
15. Gibbs G., Kirk P. *Microchemie*, 1934/35, 16, 25.
16. Габерман В. Вопросы медицинской химии, 1957, 3, 464.
17. Покровский А. Военно-медицинский журнал, 1960, 1, 30.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Глава I. Химия, физико-химия и биологические свойства белков	5
1. В. Н. Орехович. Химическое строение и биологическая специфичность белков	5
2. В. О. Шпикитер. Структура белков и методы ее изучения	16
3. Л. А. Локшина. Методы исследования химического строения белков	25
Глава II. Химия и биохимия белковых комплексов	31
1. Г. В. Троицкий. Липопротеиды плазмы крови	34
2. Е. Л. Розенфельд. Особенности строения и свойств некоторых гликопротеидов крови	38
Глава III. Химическое строение и биологические свойства нуклеиновых кислот	60
1. В. С. Тонгур. Химия и физико-химия нуклеиновых кислот	60
2. В. С. Тонгур. Биохимия нуклеиновых кислот	73
Глава IV. Химия вирусов Т. И. Тихоненко	82
Глава V. Современные представления о биосинтезе антител А. Е. Гурвич	110
Глава VI. О белках системы свертывания крови В. А. Бельцер, Е. Л. Ходорова и Т. В. Варецкая	146
Глава VII. Внутриклеточный обмен углеводов и биологическое окисление	155
1. С. Е. Северин. Гликолиз	156
2. С. Е. Северин. Пентозный цикл (прямое окисление углеводов)	164
3. С. Е. Северин. Биологическое окисление и окислительное фосфорилирование	185
Глава VIII. Энергетическая характеристика промежуточных реакций обмена веществ Л. М. Гиноман	214
Глава IX. Свойства, функции и обмен стероидных гормонов коры надпочечников Н. А. Юдаев	234
Глава X. Вопросы патологии обмена белков и аминокислот	253
1. С. Я. Капланский. Некоторые проблемы патологии обмена аминокислот	253
2. С. Я. Капланский. Функции белков крови в некоторых патологических состояниях	263
Глава XI. Ферменты в норме и патологии	274
1. А. А. Покровский. Диагностическое значение определения ферментов крови	274
2. А. А. Покровский. О механизмах действия ферментных систем веществ с ферментными системами	284
3. А. А. Покровский. Микроэкспресс-методы ферментной активности (техника проведения)	294

.....	5
специ-	5
.....	16
оения	25
.....	34
.....	34
оторых	50
иновых	66
.....	66
.....	73
.....	82
р в и ч	119
ц е р,	146
ение	156
.....	156
ов)	174
сфори-	185
обмена	214
надпо-	234
.....	253
обмена	253
азлич-	263
.....	274
и фер-	274
ческих	291
и фер-	311



X-5

(6)

100-55-1001

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОЦЕССОВ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ